

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

Papel de *Ing1* como supresor de tumores: estudio del fenotipo tumoral y de respuestas mediadas por p53 en animales deficientes en *Ing1* e identificación de reguladores del locus.

M^a del Camino Menéndez G^a de la Infanta

Madrid 2009

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Papel de *Ing1* como supresor de tumores: estudio
del fenotipo tumoral y de respuestas mediadas por
p53 en animales deficientes en *Ing1* e
identificación de reguladores del locus.**

M^a del Camino Menéndez G^a de la Infanta

Licenciada en Bioquímica

Director de Tesis: Dr. Ignacio Palmero Rodríguez

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid “Alberto Sols”
CSIC-UAM



MINISTERIO
DE CIENCIA E
INNOVACIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
"ALBERTO SOLS"

Ignacio Palmero, PhD
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Arturo Duperier, 4.
E-28029 Madrid, SPAIN
Tfn: 34 91 585 4491
Fax: 34 91 585 4401
email: ipalmero@iib.uam.es

IGNACIO PALMERO RODRÍGUEZ, Científico Titular del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM,

certifico que:

CAMINO MENÉNDEZ GARCÍA DE LA INFANTA, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo de investigación titulado:

"Papel de *Ing1* como supresor de tumores: estudio del fenotipo tumoral y respuestas mediadas por p53 en animales deficientes en *Ing1* e identificación de reguladores del locus."

Considero que el mencionado trabajo reúne la originalidad y calidad científica requeridas para poder ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos, firmo el presente certificado,
en Madrid, a 10 de Agosto de 2009

Fdo: Ignacio Palmero
Científico Titular, CSIC

Vº Bº: Miguel Manzanares
Profesor Honorario Dpto
Bioquímica.

C/Arturo Duperier, nº 4
28029 MADRID
ESPAÑA
TEL. 91 585 4400
FAX: 91 585 4401

A mi familia.

A Ricardo.

*La ciencia se compone de errores,
que a su vez, son los pasos hacia la verdad.*

Julio Verne.

Agradecimientos.

Aunque aún me parezca mentira a llegado el momento en el que tantas veces pensamos durante la escritura de la tesis, el momento de escribir lo que para todos es más ameno pero que al final resulta más complicado. Y es que son muchas las personas que me han acompañado en estos últimos años, muchas las personas sin cuyo apoyo, fuerza y cariño no habría podido terminar esta etapa; y muchas las personas que han estado presentes no sólo en esta, sino también en el resto de etapas de mi vida. A todas ellas va dedicado este apartado de la tesis.

En primer lugar quiero dar las gracias a Ignacio Palmero. Sin duda esta tesis ha sido posible gracias a ti. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por confiar en mí desde el principio, por tus consejos, tu apoyo y por no perder la esperanza. Eso me ha dado fuerzas para continuar en los malos momentos.

Quisiera agradecer también a los Dr. José González Castaño, Pedro Bonay y Manuel Fresno, por introducirme en el mundo de la ciencia, y a toda la gente del CBM por compartir conmigo esa primera experiencia; gracias por vuestros consejos, vuestras enseñanzas y vuestro interés.

Por supuesto, tengo que dar las gracias a toda la gente del 1.4 que me ha acompañado durante esta etapa. Y digo 1.4 porque para mí el 1.4.1 y 1.4.2 somos un único laboratorio. Sois ya muchos los que habéis pasado por aquí y cada uno a dejado su huella en mí. Gracias a todos por todos estos años, por tantos momentos inolvidables, sin vosotros si que no habría sido posible. Gracias a todos por hacer del laboratorio un lugar tan ameno para trabajar, por no ser sólo compañeros de trabajo sino también amigos, no habría podido imaginar mejores compañeros para esta etapa. En especial quiero dar las gracias a María, Esther y Lara, vosotras me devolvisteis la ilusión y me animasteis en los momentos difíciles, muchísimas gracias por estar ahí, por acogerme desde el primer momento y hacer tan fácil trabajar a vuestro lado. A las niñas del 1.4.2, Leti y Bárbara, gracias por ser como sois, por vuestra frescura, por ofrecer siempre una sonrisa, por saber escuchar y por vuestra amistad. A los niños del 1.4, gracias a todos por vuestra ayuda, qué habría hecho yo con los ratones sin vosotros!!! Gracias por poner ese punto diferente en las conversaciones de las comidas, bien con el fútbol, la lengua española, o ciertas extravagancias. Gracias por esas magdalenas de chocolate!!! También quiero dar las gracias a Carmela, gracias por estar siempre dispuesta a escuchar y por todos tus consejos.

En definitiva, gracias a todos por hacer que me lleve tan buenos recuerdos, habéis puesto el listón muy alto y dudo que pueda encontrar compañeros como vosotros en otro sitio.

También son muchas las personas de otros laboratorios que me han ayudado durante esta etapa. Quiero dar las gracias a la gente del 1.12 y del 1.13, por estar siempre dispuestos a echar una mano, por sacar tiempo para enseñar y ayudar, siempre con un buen gesto y una sonrisa. De verdad que se agradece. Gracias también a la gente del 2.4.1 y 2.4.2, no sólo por el apoyo y las penas compartidas, sino también por todos los momentos “no científicos” que hemos vivido, esas celebraciones, cumpleaños y comidas que hacen más llevadero el día a día. Por supuesto, quiero dar las gracias a la gente del 0.3; gracias por vuestro interés y por estar siempre dispuestos a ayudar. Y, como no, a la gente del 0.2, gracias por compartir todas las comidas, por vuestro interés y por todo el ánimo que me habéis dado.

Además quiero dar las gracias a la gente de los servicios del IIB, seguro que sin vuestra ayuda no habría podido realizar este trabajo. Especialmente quiero agradecer a la gente del animalario todo el apoyo que me han prestado. Gracias a Ruth, Saleta, Mati, Iliana y el resto de chicas que desde el principio me habéis ayudado, siempre con una sonrisa, y me habéis enseñado a manejar a los ratoncillos. Gracias a todas por vuestro interés, y por hacer que bajar al animalario no fuera tan pesado. Agradecer también a la gente de imagen toda la ayuda prestada durante este tiempo, gracias por todas esas cuantificaciones, fotos, impresiones y demás. Gracias también a la gente del servicio de secuenciación, en especial a Diana, gracias por tu paciencia y por ayudarme a realizar los arrays a pesar de todas las complicaciones que surgieron. Por supuesto, gracias también a la gente de informática, en especial a Javi, Guti y Nani. Gracias no sólo por vuestra ayuda sino también por vuestros consejos y por estar ahí para escuchar. Quiero dar las gracias también a la gente del laboratorio de Juana María Flores, en la facultad de veterinaria de la UCM, por hacerme un hueco en vuestro laboratorio y por enseñarme a hacer las inmunohistoquímicas.

Por otro lado, también son muchas las personas, fuera del campo “científico” que me han acompañado en esta etapa, así como en muchas otras, y que siempre me han brindado su apoyo, su cariño y su amistad.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis “Biólogas, Bioquímicas, Ciencialimentólogas y Consortes”. No se cómo agradeceros todos estos años, vosotras mejor que nadie sabéis lo que nos ha costado y por todo lo que hemos pasado para llegar hasta aquí. Gracias a todas por estar ahí siempre, por darme tantos ánimos, por todos vuestros consejos y vuestro interés; gracias por esas tardes de terapia en La Vaguada que tan bien venían para desahogarse. Hemos vivido ya muchas cosas juntas... y aún nos quedan muchas más por vivir. Gema, tu eres la siguiente, mucha fuerza que podrás con ellas!!! Os quiero mucho a todas. Mil gracias!!!.

Por supuesto quiero dar las gracias a mis amigas de siempre, hay que ver qué lejos estáis!!! Con vosotras he vivido mil experiencias, habéis estado ahí desde el principio, gracias por seguir ahí a pesar de la distancia y de lo poco que nos vemos. Gracias por seguir preocupándoos por mí, por vuestras llamadas. Raquel, que decir... creo que eres una de las personas más importantes en mi vida. Gracias por esas charlas, por los gabinetes de crisis que tan bien nos vienen, gracias por saber escuchar y por darme buenos consejos. Leyre, nos conocemos desde micos, creo que has estado presente en todos los momentos importantes de mi vida, gracias por estar también en este, y espero que en muchos más. Ana, mil gracias por estar tan pendiente de mi este verano, te agradezco muchísimo todas las llamadas y los mensajes de ánimo, te debo una visita y ten por seguro que en cuanto pueda voy para allá, o vienes..... Ojalá estuvierais más cerca para poder vernos más....

Como no, tengo que dar las gracias a mi familia. Sin vosotros no sería quien soy y no habría llegado hasta aquí. En especial quiero dar las gracias a mis padres y hermanos. Emi, gracias por ser tan buen hermano mayor, por preocuparte y cuidarme, gracias por ayudarme cuando me vine a Madrid, por no dejarme sola, no se qué habría hecho sin ti. Ana, gracias por ser así, esa pequeña borde pero tierna en el fondo, gracias por haber compartido conmigo tantos buenos momentos. Me encanta verte tan feliz aunque sea tan lejos.... Andrea, el pequeño torbellino, gracias por tu alegría, por tus historias, por ser así. A mis padres quiero agradecerles el apoyo incondicional que me han dado siempre, gracias por estar siempre ahí, por ayudarme en todo momento, sin vosotros no sería quien soy. Ama, me quedo sin palabras para agradecerte todo lo que me has dado, gracias por enseñarme a ser quien soy, por cuidarme y preocuparte por mí siempre pero permitiéndome crecer. Mil gracias. Aita, buf esto es aún más difícil, gracias por apoyarme siempre, por ayudarme a conseguir mis metas, por no dejar de animarme. Gracias, en definitiva, por todo. Quiero dar las gracias también al resto de mi familia, a mi abuela, tíos y primos; y a mi familia política a los que considero también mi familia; gracias a todos por interesaros tanto por mi trabajo, por vuestro cariño y por vuestro apoyo.

Esta tesis quiero dedicársela especialmente a mi abuelo Paco. Gracias por ser tan buen abuelo, por quererme y cuidarme siempre, gracias por permitirme tener tan buenos recuerdos tuyos relacionados con todos los momentos de mi vida. Gracias también por interesarte tanto por mi trabajo, por preguntarme siempre por “mis bichitos”, ojalá estuvieras aquí para verlo terminado. Te hecho mucho de menos.

Por último, quiero dar las gracias a Ricardo, la persona más importante en mi vida y, sin duda, la persona que más me ha ayudado en esta etapa. Sabes que sin tu apoyo no habría realizado este trabajo, gracias por creer en mí desde el principio, por no fallarme nunca

y no permitirme abandonar. Gracias por verme con tan buenos ojos y por hacerme sentir tan especial cada vez que me miras. Gracias por estos pocos fines de semana juntos, por todas las experiencias, por todo lo que hemos compartido y por querer compartir más. No soy capaz de imaginar el resto de etapas de mi vida sin ti. Te quiero mucho.

Resumen.

ING1 pertenece a la familia de supresores tumorales *ING*, altamente conservada durante la evolución. Estudios a nivel celular han caracterizado la participación de *ING1* en importantes respuestas de protección antitumoral como reparación del ADN, apoptosis o senescencia celular. La proteína ING1b, al igual que el resto de miembros de la familia, participa en el control de la expresión génica mediante regulación de la cromatina, ya que es capaz de reconocer marcas específicas de histonas e interaccionar con complejos con actividad histona acetil transferasa o histona deacetilasa. Por otro lado, también se ha propuesto que ING1b puede llevar a cabo sus funciones en cooperación con el supresor tumoral p53, aunque hay cierta controversia en este campo ya que existen evidencias tanto a favor como en contra de una relación funcional entre ambas proteínas. De acuerdo con su papel como supresor tumoral, se han detectado diferentes alteraciones del locus *ING1* en varios tipos de tumores humanos.

En este trabajo hemos utilizado un modelo animal de deficiencia en el locus *Ing1* para estudiar el papel de este locus en respuestas de protección antitumoral a nivel celular y de organismo, así como su conexión funcional con el supresor tumoral p53. El estudio de respuestas a diferentes estímulos de estrés en fibroblastos embrionarios obtenidos de estos animales nos ha permitido apreciar que el efecto de la deficiencia de *Ing1* en activación de p53 en fibroblastos parece ser específico del estímulo aplicado. A nivel de organismo, hemos observado que la deficiencia en *Ing1* implica un defecto en la acumulación de p53, en respuesta a irradiación, de forma dependiente del órgano analizado. Mediante un análisis de la expresión de genes relacionados con p53 en el timo de animales sometidos a irradiación hemos observado que los animales deficientes en *Ing1* presentan alterada la expresión de varios genes implicados en regulación del ciclo celular y de la apoptosis en este órgano.

Por otro lado, hemos analizado el fenotipo tumoral de animales deficientes en *Ing1* mediante varios modelos de tumorigénesis como la carcinogénesis química en piel, la inducción de fibrosarcomas por 3-metilcolantreno, o la aparición de melanomas en un modelo transgénico. Los datos obtenidos hasta el momento no indican un impacto claro de la deficiencia de *Ing1* en los modelos de carcinogénesis analizados.

Por último, hemos utilizado nuestro modelo de deficiencia en *Ing1* para realizar una búsqueda de posibles reguladores del locus, que ha llevado a la identificación de varios posibles reguladores de *Ing1*.

En conjunto, el trabajo descrito en esta tesis aporta nuevos datos sobre el papel de *Ing1* como supresor tumoral y su relación funcional con la proteína p53, además de la identificación de posibles reguladores del locus.

Abstract.

ING1 belongs to the *ING* tumor suppressor family, highly conserved during evolution. Studies at the cellular level have characterized the involvement of *ING1* in relevant protective antitumor responses such as DNA repair, apoptosis or cellular senescence. The ING1b protein, like other family members, participates in the control of gene expression by chromatin regulation, since it is able to recognize specific histone marks and interact with complexes with histone acetyl transferase and histone deacetylase activity. Also, it has been proposed that ING1b can carry out its functions in cooperation with the p53 tumor suppressor, although there is some controversy in this topic, with evidence both for and against the existence of a functional relationship between the two proteins. Consistent with its role as a tumor suppressor, a variety of alterations of the *ING1* locus have been detected in several types of human tumors.

In this work, we have used mice deficient in the *Ing1* locus to study the role of this locus in protective antitumor responses at a cellular and organism level, and its functional connection with the p53 tumor suppressor. The study of responses to different stress stimuli in embryonic fibroblasts derived from these animals indicates that the effect of *Ing1* deficiency in p53 activation in this cell type appears to be specific of the stimulus applied. At organism level, we have observed that *Ing1* deficiency leads to a defect in p53 accumulation in response to irradiation, dependent on the organ analyzed. Analyzing the expression of genes associated with p53 in the thymus of animals subjected to irradiation, we have observed that *Ing1*-deficient animals show changes in the expression of several genes involved in cell cycle regulation and apoptosis in this organ.

Furthermore, we have analyzed the tumor phenotype of *Ing1*-deficient animals in several models of tumorigenesis, such as chemical carcinogenesis in skin, induction of fibrosarcomas by 3-methylcholanthrene or the appearance of melanoma in a transgenic model. The data obtained so far do not indicate a clear impact of *Ing1* deficiency in the carcinogenesis models analyzed.

Finally, we have used our model of *Ing1* deficiency to perform a screening of regulators of the *Ing1* locus, which has led to the identification of several potential regulators of the locus.

Overall, the work described in this thesis provides new data on the role of *Ing1* as a tumor suppressor and its functional relationship with the p53 protein, as well as on the regulation of the locus.

Índice.

Agradecimientos.	III
Resumen.	IX
Abstract.	XIII
Índice.	3
Clave de Abreviaturas.	7
Introducción.	11
1.- Familia de proteínas ING.	11
1.1.- El locus <i>ING1</i> .	12
1.2.- La proteína ING1b.	13
1.2.1.- Estructura de ING1b.	13
1.2.2.- Funciones de ING1b.	14
1.2.3.- Regulación de ING1b.	16
1.2.4.- Alteraciones de ING1b en tumores.	17
2.- La proteína p53.	18
2.1.- Funciones de p53.	18
2.1.1.- p53 y apoptosis.	19
2.1.2.- p53 y senescencia.	20
2.2.- Regulación de p53.	21
3.- Conexión entre ING1b y p53.	23
4.- Senescencia y supresión tumoral <i>in vivo</i>.	25
Objetivos.	31
Materiales y Métodos.	35
1.- Cultivos celulares.	35
1.1.- Determinación de la tasa de síntesis de ADN.	35
1.2.- Protocolo de pases seriados 3T3.	36
1.3.- Ensayos de supervivencia celular.	36
1.4.- Infección retroviral.	36
1.5.- Ensayo de búsqueda de reguladores de <i>Ing1</i> .	37
2.- Ensayos con animales.	37
2.1.- Generación de ratones deficientes en <i>Ing1</i> .	37
2.2.- Animales transgénicos Tyr::N-Ras ^{Q61K} deficientes en <i>Ing1</i> .	38
2.3.- Protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón.	38

2.4.- Respuesta inflamatoria a TPA.	38
2.5.- Ensayo de formación de fibrosarcomas.	39
2.6.- Ensayo de tumorigénesis en ratones desnudos nu/nu.	39
2.7.- Análisis de expresión génica.	39
3.- Métodos bioquímicos.	40
3.1.- Inmunoblot o <i>Western-blot</i> .	40
3.2.- Inmunoprecipitación.	41
3.3.- RT-PCR y PCR cuantitativa.	41
3.4.- Inmunohistoquímica.	42
Resultados.	47
1.-Caracterización de un modelo de deficiencia en <i>Ing1</i>.	47
2.- Efecto de la deficiencia de ING1b en respuestas mediadas por p53.	49
2.1.- Estudio de los procesos de proliferación, immortalización y senescencia celular en fibroblastos embrionarios de ratón.	49
2.2.- Análisis de la respuesta a estrés genotóxico en ausencia de ING1b.	50
2.2.1.- Estudio de la respuesta a daño en el ADN en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en el locus <i>Ing1</i> .	50
2.2.2.-Análisis de la respuesta a estrés genotóxico mediada por p53 en animales deficientes en <i>Ing1</i> .	52
3.- Papel de <i>Ing1</i> en supresión tumoral.	58
3.1.- Caracterización de animales deficientes en <i>Ing1</i> .	58
3.2.- Implicación de <i>Ing1</i> en respuesta a estrés oncogénico <i>in vivo</i> .	59
3.2.1.- Modelo de carcinogénesis química en piel de ratón (DMBA/TPA).	61
Efecto de la deficiencia de <i>Ing1</i> en aparición y progresión de papilomas.	62
Estudio del comportamiento de ING1b en el protocolo de carcinogénesis química en piel.	67
Implicación de ING1b en procesos inflamatorios.	68
3.2.2.- Modelo de inducción de fibrosarcomas (3-metilcolantreno).	70
3.2.3.- Efecto de la deficiencia de <i>Ing1</i> en la aparición de melanoma.	73
4.-Búsqueda de posibles reguladores del locus <i>Ing1</i>.	76
Discusión.	83
Conclusiones.	95
Bibliografía.	99
Anexos.	115

Clave de Abreviaturas.

ARNm:	ARN mensajero
BrdU:	Bromodeoxiuridina
DDR:	Respuesta a daño en el ADN (<i>DNA Damage Response</i>)
DMBA:	9,10-dimetil-1,2-benzantraceno
DMEM:	Medio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
FDG:	(<i>Fluorescein di-β-D-galactopyranoside</i>)
G-418:	Neomicina
Gy:	Gray
H3K4Me3:	Histona H3 trimetilada en lisina 4
HAT:	Histona acetil transferasa
HDAC:	Histona deacetilasa
LZL:	Dominio de cremalleras de leucina
MEFs:	Fibroblastos embrionarios de ratón (<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>)
NCR:	Nueva región conservada (<i>Novel Conserved Region</i>)
NLS:	Secuencia de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Sequence</i>)
NTS:	Secuencia de localización nucleolar
PBR:	Región polibásica (<i>Polibasic Region</i>)
PHD:	Homeodominio (<i>Plant Homeo Domain</i>)
PIP:	Dominio de interacción con PCNA (<i>PCNA Interacting Protein Motif</i>)
PIPs:	Fosfoinosítidos fosfato
SAID:	Dominio de interacción con SAP30 (<i>SAP30 Interacting Domain</i>)
SA-β-Gal:	Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia
TPA:	Forbol 12-miristato 13-acetato.
UV:	Radiación ultravioleta
UV-B:	Radiación ultravioleta-B
UV-C:	Radiación ultravioleta-C
wt:	Silvestre (<i>Wild Type</i>)

Introducción.

El cáncer es una enfermedad compleja que surge como consecuencia de la acumulación gradual de alteraciones genéticas o epigenéticas en las células. Estas alteraciones favorecen la adquisición de nuevas capacidades fenotípicas que permiten a las células neoplásicas liberarse de los procesos que regulan la proliferación celular normal (Hanahan y Weinberg, 2000).

Las células se encuentran sometidas a gran variedad de estímulos potencialmente oncogénicos que pueden proceder tanto del interior celular como del ambiente en el que se encuentran, por lo que han desarrollado mecanismos de defensa capaces de impedir la transformación neoplásica. Cuando estas barreras antioncogénicas dejan de ser funcionales estos estímulos pueden dar lugar a alteraciones en la homeostasis celular, lo que representa el primer paso en la formación de un tumor (Ponder, 2001; Hahn y Weinberg, 2002a; b). Entre los mecanismos de supresión tumoral destacan la muerte celular programada, o apoptosis, y la senescencia celular; procesos por los cuales una célula dañada es eliminada o se impide su proliferación.

1.- Familia de proteínas ING.

Las proteínas ING (*Inhibitor of Growth*) forman una familia de proteínas altamente conservada desde levaduras hasta humanos (He et al., 2005). En mamíferos, esta familia está formada por cinco loci (*ING1-ING5*), algunos de los cuales codifican diversas proteínas por procesamiento alternativo (Ythier et al., 2008). Esta familia de proteínas se ha implicado en múltiples procesos celulares relacionados con supresión tumoral como regulación negativa de la proliferación celular, inducción de apoptosis, reparación del ADN, senescencia, inhibición de angiogénesis y migración (Menéndez et al., 2009; Shah y Riabowol, 2009; Li et al., 2009; Coles y Jones, 2009).

Los miembros de la familia de proteínas ING comparten una estructura similar presentando un extremo carboxi-terminal muy conservado y un extremo amino-terminal variable. El extremo C-terminal se caracteriza por la presencia de un dominio PHD (*Plant Homeo Domain*) altamente conservado. Este dominio está implicado en interacciones proteína-proteína, en procesos de remodelación de cromatina, y en reconocimiento de marcas de histonas, ya que permite la interacción específica con la histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4Me3). De los otros dominios conservados entre los diferentes miembros de esta familia destacan también el dominio de localización nuclear (NLS), situado en la zona central de las proteínas, el cual es crítico para que lleven a cabo sus funciones, y un dominio NCR (*Novel Conserved Region*) que parece estar implicado en la interacción con complejos con actividad histona acetil transferasa (HAT) e histona deacetilasa (HDAC) (Soliman y Riabowol, 2007;

Coles y Jones, 2009). El extremo N-terminal varía de unas proteínas a otras y presenta dominios de interacción con otras proteínas (Figura 1).

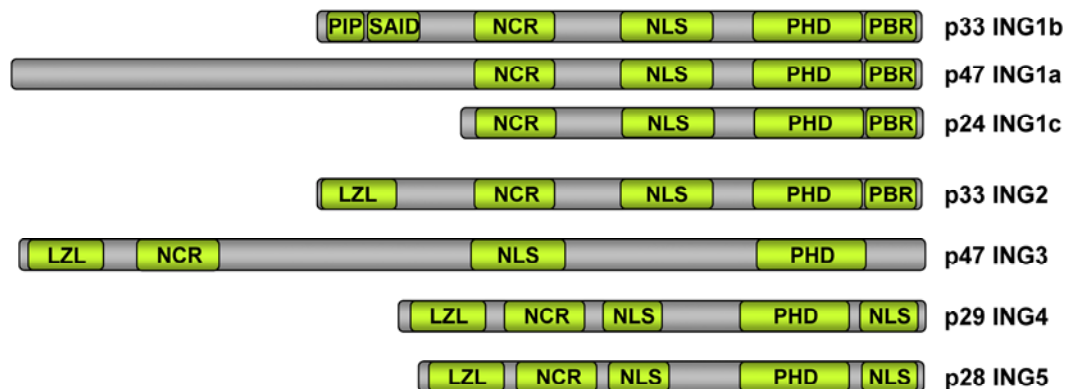


Figura 1: Representación esquemática de los miembros de la familia de proteínas ING. PIP: dominio de interacción con PCNA; SAID: dominio de interacción con SAP30; NCR: nueva región conservada; NLS: secuencia de localización nuclear; PHD: homeodominio; PBR: región polibásica; LZL: dominio de cremalleras de leucina.

1.1 El locus *ING1*.

ING1 es el miembro fundador de la familia de proteínas ING, se identificó en una búsqueda de genes con expresión disminuida en líneas celulares de cáncer de mama, y por tanto, posibles supresores tumorales (Garkavtsev et al., 1996).

El locus *ING1* humano está formado por cuatro exones (1b, 1c, 1a y 2) que, por procesamiento alternativo, dan lugar a tres transcritos diferentes siendo el exón 2 común a todos ellos. La traducción de estos transcritos genera tres proteínas: p33ING1b, p47ING1a y p24ING1c; dado que el exón 1c no contiene secuencia codificante, la proteína p24ING1c se genera a partir de un codón iniciador presente en el exón 2 (Feng et al., 2002; Nouman et al., 2003).

El locus *Ing1* de ratón, al igual que el humano, está formado por cuatro exones que también dan lugar a tres transcritos distintos como consecuencia del procesamiento alternativo de su ARN mensajero (ARNm). En este caso, la traducción de los transcritos da lugar únicamente a dos proteínas: p33ING1b y p24ING1c, ya que en ratón los exones 1a y 1c no presentan secuencia codificante (Zeremski et al., 1999) (Figura 2).

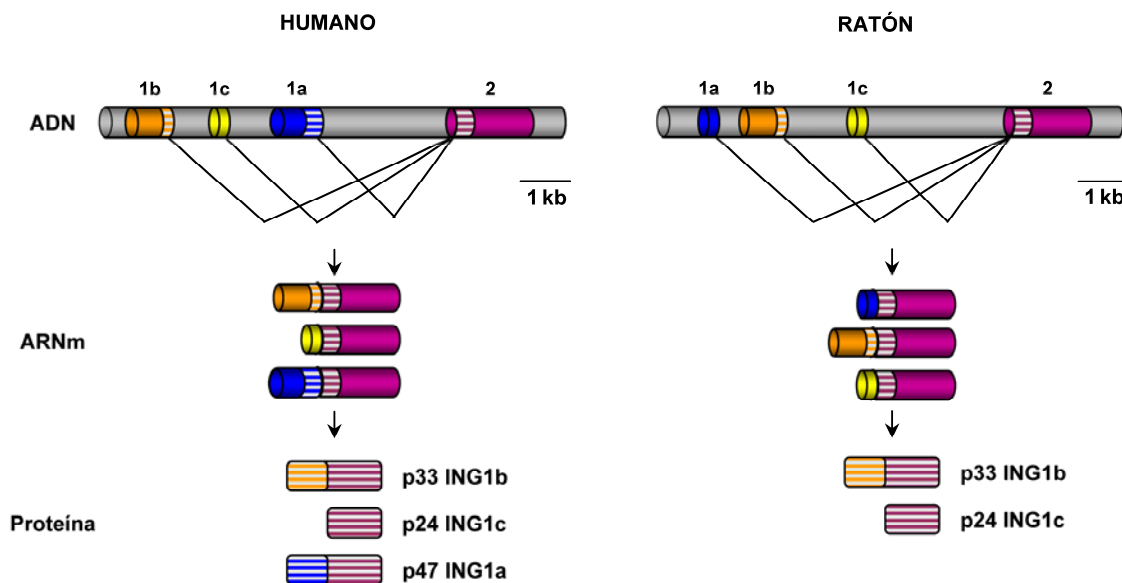


Figura 2: Estructura del locus *ING1* humano y de ratón. Se muestra en cada caso la estructura del locus génico, los transcritos alternativos y las proteínas codificadas.

1.2.- La proteína ING1b.

1.2.1.- Estructura de ING1b.

La proteína ING1b, también llamada p33ING1b, p33ING1 o p37ING1b en ratón, consta de 279 aminoácidos. Existe un alto grado de homología entre la proteína humana y la de ratón y ambas comparten la misma estructura. El extremo N-terminal de ING1b presenta dominios involucrados en la interacción con otras proteínas como el dominio PIP (*PCNA Interacting Protein Domain*) implicado en la interacción con PCNA tras daño en el ADN producido por radiación ultravioleta (UV), el dominio SAID (*SAP30 Interacting Domain*) por el que ING1b interacciona con SAP30, proteína asociada a Sin3a (Shi y Gozani, 2005; Goeman et al., 2005), o el dominio NCR por el que, además de interactuar con complejos HAT y HDAC, ING1b interacción con la Lamina A (Soliman y Riabowol, 2007; Han et al., 2008; Coles y Jones, 2009); también se ha descrito que el extremo N-terminal de ING1b es esencial para su interacción con el supresor tumoral p19ARF (González et al., 2006). En el dominio de localización nuclear de esta proteína se han encontrado tres secuencias de localización nucleolar (NTS) implicadas en la translocación de ING1b al nucléolo en respuesta a diferentes tipos de estrés (Scott et al., 2001a). En el extremo C-terminal, además del dominio PHD característico de esta familia de proteínas, ING1b presenta un dominio rico en aminoácidos básicos denominado PBR (*Polibasic Region*) que se ha relacionado con la interacción con fosfoinosítidos fosfato (PIPs) (Feng et al., 2002; Soliman y Riabowol, 2007) (Figura 1).

1.2.2.- Funciones de ING1b.

ING1b es una proteína nuclear y de expresión ubicua; se ha detectado su expresión en embriones de ratón de diferentes estadios de desarrollo así como en órganos de animales adultos (Zeremski et al., 1999). Al igual que el resto de proteínas de la familia, ING1b se ha relacionado con funciones implicadas en supresión tumoral como reparación del ADN, apoptosis y senescencia celular, así como en procesos de remodelación de la cromatina.

El estado de compactación de la cromatina determina la accesibilidad de diversas proteínas al ADN y, por tanto, regula los procesos de expresión génica, síntesis y reparación del ADN. El grado de compactación de la cromatina se regula principalmente por modificaciones posttraduccionales, como acetilación y metilación, que sufren los extremos amino-terminal de las histonas. Las proteínas ING carecen de actividad enzimática, múltiples estudios han demostrado que estas proteínas forma parte de complejos con actividad histona acetil transferasa (HAT), histona deacetilasa (HDAC) y ADN metiltransferasa, implicados en las modificaciones posttraduccionales de las colas de histonas (Doyon et al., 2006). Recientemente se ha propuesto el mecanismo por el cual las proteínas ING conectan las actividades modificadoras de histonas con la regulación transcripcional. Se ha descrito que las proteínas ING son capaces de reconocer específicamente a la histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4Me3) e interaccionar con ella a través de su dominio PHD (Shi et al., 2006; Pena et al., 2006; Palacios et al., 2008; Pena et al., 2008; Champagne y Kutateladze, 2009); el reconocimiento de esta marca de histona permite la unión a zonas específicas de la cromatina de complejos con actividad HAT y HDAC que modificarán el estado de acetilación de las colas de histonas permitiendo la activación o represión transcripcional (Shi y Gozani, 2005; Soliman y Riabowol, 2007). La proteína ING1b se ha asociado tanto a complejos con actividad HAT, por su interacción con proteínas como p300, CBP, PCAF o TRRAP (Vieyra et al., 2002), como a complejos con actividad HDAC, como HDAC1 o Sir2 (Skowyra et al., 2001; Kuzmichev et al., 2002; Kataoka et al., 2003; Goeman et al., 2005) y a complejos con actividad ADN metiltransferasa por su asociación con DMAP1 (Xin et al., 2004). Diversos estudios muestran que, a pesar de su relación con complejos tanto activadores como represores de la transcripción, el papel predominante de ING1b en regulación transcripcional es como represor transcripcional (Kuzmichev et al., 2002; Goeman et al., 2005; Gómez-Cabello, manuscrito enviado). De acuerdo con este modelo de actuación de las proteínas ING, se ha descrito que mutaciones en el dominio PHD de ING1b afectan a su capacidad de interaccionar con H3K4Me3 y de inducir procesos de reparación del ADN y de apoptosis celular (Pena et al., 2008; Coles y Jones, 2009).

La apoptosis, o muerte celular programada, es uno de los mecanismos que el organismo ha desarrollado para eliminar las células dañadas. Se han descrito dos rutas

principales de apoptosis en células de mamíferos: la ruta extrínseca, mediada por la activación de receptores presentes en la membrana celular; y la ruta intrínseca, que tiene lugar en la mitocondria. Diversos eventos pueden inducir esta respuesta celular como por ejemplo el tratamiento con drogas citotóxicas, diferentes tipos de radiación o la privación de factores de crecimiento.

El elevado nivel de expresión de la proteína ING1b en las colas de renacuajos de *Xenopus* durante su reabsorción, así como la disminución de la viabilidad celular de fibroblastos inmortalizados de ratón al sobreexpresar ING1b, fueron las primeras evidencias que relacionaron a esta proteína con el proceso de apoptosis (Helbing et al., 1997; Campos et al., 2004a). Posteriormente, diversos estudios en líneas celulares han confirmado la implicación de ING1b en esta respuesta celular; así se ha descrito que la sobreexpresión de ING1b induce apoptosis en líneas celulares derivadas de gliomas (Shinoura et al., 1999), en líneas celulares derivadas de melanoma tras radiación con UV-B (Cheung y Li, 2002) o en líneas celulares derivadas de osteosarcoma tras el tratamiento con etoposido, un agente citotóxico (Zhu et al., 2006).

Se han descrito varios mecanismos por los que ING1b puede regular el proceso de apoptosis: por una parte se ha descrito que ING1b es capaz de favorecer la transactivación de proteínas proapoptóticas como BAX tras diversos estímulos citotóxicos (Cheung y Li, 2002; Zhu et al., 2006); además, ING1b se ha relacionado con la expresión de HSP70, proteína que promueve la apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral, TNF- α (Feng et al., 2006); por último, diversos estudios han descrito que, en respuesta a radiación UV, ING1b interacciona con PCNA, factor de procesividad de la ADN polimerasa implicado en los procesos de replicación y reparación del ADN, esta interacción es necesaria para que ING1b induzca apoptosis en respuesta a irradiación con UV en fibroblastos humanos (Scott et al., 2001a; Scott et al., 2001b).

Diversas evidencias han relacionado a la proteína ING1b con regulación de la proliferación y senescencia celular (ver más adelante). Ensayos de pérdida de expresión de esta proteína por interferencia del ARNm muestran un aumento de la capacidad proliferativa de células primarias (Garkavtsev y Riabowol, 1997). Por otra parte, ensayos de sobreexpresión muestran que ING1b es capaz de inducir una parada de la proliferación celular tanto en fibroblastos humanos como en fibroblastos embrionarios de ratón, acompañada de la adquisición de características de células senescentes (Garkavtsev et al., 1996; Goeman et al., 2005; González et al., 2006).

Se ha descrito que ING1b está implicada en la regulación de diversas proteínas relacionadas con el ciclo celular; así se ha visto que la sobreexpresión de ING1b induce la expresión de p21^{CIP1}, inhibidor de complejos CDK-ciclina, responsable de la parada de ciclo celular en G1 a través de p53 (Garkavtsev et al., 1998; González et al., 2006), e inhibe la

expresión de la ciclina B1 (Takahashi et al., 2002). Estudios con mutantes de delección de ING1b que pierden la capacidad de regular la transactivación de p21^{CIP1} confirman la relación existente entre la regulación de la expresión génica por ING1b y la parada de la proliferación celular, ya que células que sobreexpresan estas construcciones no ven alterada su capacidad proliferativa (Goeman et al., 2005; González et al., 2006).

La entrada en senescencia va acompañada de cambios en la estructura de la cromatina asociados a cambios en la expresión génica. Como se ha comentado anteriormente, ING1b, al igual que el resto de proteínas de la familia, se ha relacionado con procesos de remodelación de cromatina; estudios con fibroblastos embrionarios obtenidos de animales deficientes en *Ing1* o con formas mutantes de la proteína ING1b que pierden la capacidad de interaccionar con la H3K4Me3, muestran la importancia de la remodelación de la cromatina por *Ing1* en su capacidad de regular senescencia (Abad et al., 2007; Menéndez et al., 2009; Abad, manuscrito enviado).

La proteína ING1b también se ha relacionado con procesos de reparación del ADN. Se ha descrito que la expresión de ING1b se induce tras radiación con UV en queratinocitos primarios y en líneas celulares derivadas de melanoma (Cheung et al., 2000). Ensayos de sobreexpresión indican que ING1b está implicada en la activación de la maquinaria responsable de llevar a cabo la reparación del ADN; además se ha descrito que ING1b es capaz de interaccionar con GADD45, proteína implicada en la parada del ciclo celular tras daño en el ADN (Cheung et al., 2001), y de permitir el acceso de la maquinaria de reparación a la cromatina (Kuo et al., 2007) (Figura 4).

1.2.3.- Regulación de ING1b.

Existen pocos datos acerca de los mecanismos que regulan la expresión de la proteína ING1b. En estudios con *Xenopus* y con crías de caimanes se ha relacionado la señalización de la hormona tiroidea con la modulación de la expresión de varias proteínas ING (Wagner y Helbing, 2005; Maher y Helbing, 2009). Por otra parte, mediante análisis *in silico* se ha descrito la presencia de elementos de respuesta a radicales libres de oxígeno y a hidrocarburos en el promotor de *ING1* (Burchiel et al., 2007). Los radicales libres de oxígeno activan la vía de TGF- β por mecanismos directos e indirectos. Recientemente se ha descrito que la expresión ectópica del factor de transcripción RUNX3 en líneas celulares derivadas de carcinoma gástrico induce la expresión de ING1b (Nagahama et al., 2008). El factor de transcripción RUNX3 es considerado un factor clave en la inducción de apoptosis mediada por TGF- β ya que está implicado en la activación de proteínas proapoptóticas como Bim y de proteínas relacionadas con la parada de ciclo celular como p21^{CIP1} (Maher y Helbing, 2009).

Diversos estudios han demostrado que la actividad de la proteína ING1b se regula por fosforilación. Existen evidencias de que la serina 126 de ING1b es fosforilada por la proteína quinasa Chk1 en respuesta a estrés genotóxico, esta fosforilación estabiliza a la proteína y regula la proliferación de células de melanoma (Garate et al., 2007). También se ha descrito fosforilación de la serina 199 de ING1b, esta modificación permite la interacción entre ING1b y la proteína 14-3-3 lo que conlleva la translocación de ING1b al citoplasma (Gong et al., 2006).

Por último, la actividad de la proteína ING1b se encuentra regulada por su interacción con diversas proteínas. Se ha descrito que ING1b es capaz de interaccionar por su dominio PBR con fosfoinosítidos fosfato en respuesta a señales de estrés, esta interacción dirige la localización de ING1b, y sus complejos asociados, a una región subnuclear específica (Shi y Gozani, 2005). Por otra parte, se ha propuesto que ING1b interacciona con la Lamina A, componente de la envuelta nuclear, a través de un dominio conservado en el extremo N-terminal, esta unión parece mantener la localización nuclear de ING1b y es necesaria para la inducción de apoptosis (Han et al., 2008). También se ha descrito interacción entre la proteína ING1b y el supresor tumoral p19ARF, esta interacción modifica la localización subnuclear de ING1b dirigiéndola al nucléolo y parece ser necesaria para la parada de ciclo celular y la activación de genes como p21^{CIP1} por ING1b (González et al., 2006).

Dada la implicación de la proteína ING1b en importantes respuestas antitumorales, consideramos que es necesario un estudio más detallado de su regulación transcripcional; la búsqueda de nuevos reguladores de esta proteína puede ayudar a comprender mejor su papel como supresor tumoral.

1.2.4.- Alteraciones de ING1b en tumores.

De acuerdo con su papel como supresor tumoral, se han encontrado alteraciones de ING1b en diversos tumores humanos. La alteración más frecuentemente observada en tumores es la disminución de los niveles de expresión tanto del ARNm como de la proteína. El locus *ING1* humano se encuentra localizado en la región cromosómica 13q33-34, una zona de frecuente pérdida de heterocigosidad en tumores (Zeremski et al., 1997; Garkavtsev et al., 1997); además se ha descrito silenciamiento por metilación del promotor de *ING1* en tumores de ovario (Shen et al., 2005). Diversos estudios han relacionado la expresión disminuida de *ING1* con una mayor malignidad tumoral (Toyama et al., 1999; Vieyra et al., 2003).

Por otra parte, también se han descrito casos de localización aberrante de la proteína ING1b en tumores; así se ha observado que en muestras de cáncer de mama, cerebro o leucemia linfoblástica entre otros, la proteína ING1b presenta una localización citoplásmica (Nouman et al., 2002; Vieyra et al., 2003; Tallen et al., 2004).

Por último, aunque son infrecuentes, también se han detectado mutaciones puntuales de ING1b en diferentes tumores humanos. Estas mutaciones afectan principalmente al dominio de localización nuclear de la proteína o a su dominio PHD. Así por ejemplo, se han descrito mutaciones en el dominio PHD de ING1b en melanoma y en tumores de esófago, de ovario o de mama entre otros (Nouman et al., 2003; Ythier et al., 2008); en melanoma, la presencia de estas mutaciones se ha relacionado con una disminución de la esperanza de vida de los pacientes (Campos et al., 2004b). Estos datos reflejan la importancia del dominio PHD de ING1b en su función como supresor tumoral.

2.- La proteína p53.

La proteína p53 es uno de los supresores tumorales más importante en mamíferos. p53 es un factor de transcripción que regula la expresión de gran variedad de genes, que codifican tanto proteínas como microARNs, responsables de llevar a cabo las respuestas celulares mediadas por p53.

2.1.- Funciones de p53.

La proteína p53 se activa en respuesta a gran variedad de estímulos de estrés como daño en el ADN, hipoxia, acortamiento telomérico, pérdida de adhesión celular, falta de nutrientes o activación de oncogenes entre otros. Esta activación conlleva la regulación selectiva por p53 de genes implicados en la inducción de diversas respuestas celulares como apoptosis, parada del ciclo celular o reparación del ADN; respuestas necesarias para proteger a la célula e impedir que células dañadas puedan seguir proliferando (Sherr y McCormick, 2002; Vousden y Lu, 2002). Recientemente se han descrito funciones de p53 que no requieren su activación por estímulos de estrés, así se ha implicado a p53 en la regulación de importantes procesos celulares como la diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la renovación de células madre, el control de procesos de migración, metabolismo y supervivencia celular o la regulación del envejecimiento celular entre otros (revisado en Millau et al., 2009; Vousden y Prives, 2009) (Figura 3).

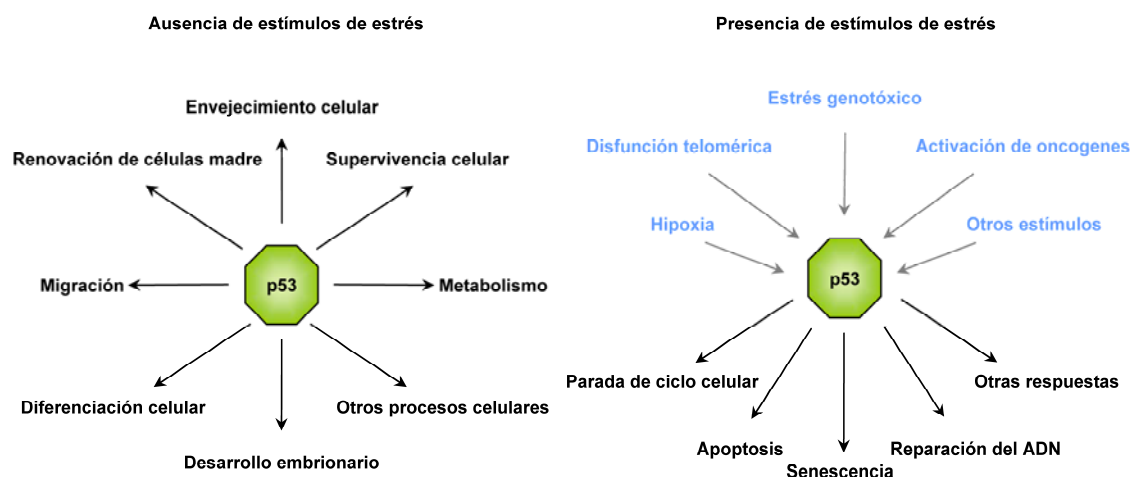


Figura 3: Funciones de p53. Se representan algunos de los procesos fisiológicos regulados por p53 así como algunas de las respuestas celulares inducidas en respuesta a estímulos de estrés.

2.1.1.- p53 y apoptosis.

La implicación de la proteína p53 en el proceso de apoptosis celular queda reflejada en modelos, tanto celulares como animales, en los que la falta de p53 supone una alteración de esta respuesta antitumoral; así se ha descrito que timocitos deficientes en p53 son más resistentes a la apoptosis inducida por radiación, o que fibroblastos embrionarios obtenidos de animales carentes de p53 son resistentes a la apoptosis inducida en respuesta tanto a estrés genotóxico como a la activación de oncogenes (Yu y Zhang, 2005). La capacidad de p53 de regular el proceso de apoptosis es importante en su función como supresor tumoral; se ha observado que la pérdida de la apoptosis mediada por p53 acelera algunos procesos tumorigénicos (Vazquez et al., 2008).

En respuesta a diversas señales de estrés p53 es capaz de inducir la expresión de genes implicados en las dos rutas apoptóticas descritas en células de mamíferos, la ruta extrínseca y la ruta intrínseca; se ha descrito que p53 regula la expresión de receptores de membrana como Fas, DR4 y DR5, y de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 como BAX, NOXA y PUMA (Wang y Harris, 1997; Yu y Zhang, 2005). Por otro lado, p53 también es capaz de inducir apoptosis por mecanismos independientes de su capacidad transactivadora, como a través de su translocación del núcleo a la mitocondria donde, mediante su interacción con proteínas anti y proapoptóticas, regulará la activación de las caspasas finalmente responsables de la muerte celular (Pietsch et al., 2008). Por último, además de regular la expresión de genes proapoptóticos, p53 también es capaz de activar genes que inhiben señales de supervivencia celular.

La participación de p53 en varias vías apoptóticas es particularmente importante en su función como supresor tumoral ya que durante el desarrollo de un tumor existe una gran

presión selectiva a perder la función de genes proapoptóticos, de esta forma p53 se asegura la inducción de la apoptosis celular (Vousden y Lu, 2002).

2.1.2.- p53 y senescencia.

La proteína p53 también se encuentra implicada en la regulación de la senescencia celular, otro de los principales mecanismos antitumorales (ver mas adelante). Estudios *in vitro* han demostrado la importancia de este supresor tumoral en la inducción de senescencia en respuesta a diferentes estímulos; por una parte, se ha descrito que la inducción de p53 en respuesta a la activación de oncogenes como Ras conlleva una parada de la proliferación celular con características de células senescentes (Serrano et al., 1997; Mallette et al., 2007), además p53 también se ha relacionado con la inducción de senescencia replicativa consecuencia del acortamiento telomérico (Artandi y Attardi, 2005). Por otro lado, estudios en modelos animales han demostrado que la reactivación de p53 en diferentes tipos de tumores conlleva la regresión de los mismos como consecuencia de la inducción de una respuesta senescente (Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007). Por último, se ha descrito que en lesiones premalignas se produce una inducción de la senescencia mediada por p53, lo que refleja su importancia a la hora de evitar el desarrollo tumoral (Vousden y Prives, 2009).

Entre las dianas transcripcionales de p53 se encuentra p21^{CIP1}. Esta proteína es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas por lo que tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular. Se sabe que p21^{CIP1} es uno de los genes activados por p53 tras estímulos de estrés, y que su inducción es esencial para que se lleve a cabo la respuesta senescente mediada por p53. Así se ha descrito que células deficientes en p21^{CIP1} no presentan alterada su proliferación tras estímulos que provocan daño en el ADN; además, animales carentes de p21^{CIP1} desarrollan tumores espontáneamente. El papel de p21^{CIP1} en supresión tumoral es dependiente de p53 ya que se ha observado que la pérdida de p21^{CIP1} no acelera la tumorigénesis en animales deficientes en p53 (Martin-Caballero et al., 2001; Efeyan et al., 2007).

La gran importancia de la proteína p53 como supresor tumoral queda reflejada en el hecho de que esta proteína se encuentra mutada aproximadamente en el 50% de los tumores humanos, en aquellos tumores en los que p53 se mantiene normal se han encontrado alteraciones en reguladores de la proteína. Generalmente las mutaciones que se observan en p53 son mutaciones puntuales que suelen ocurrir en el dominio de unión a ADN de la proteína por lo que conllevan la pérdida de función de la misma (Vousden y Lu, 2002). Estudios *in vivo* con ratones deficientes en p53 han servido para corroborar el importante papel de esta proteína en supresión tumoral. La totalidad de estos animales p53-nulos desarrollan tumores,

entre los que destacan linfomas de células T y sarcomas, con un periodo de latencia considerablemente menor al de los tumores obtenidos en animales silvestres, presentando la mayoría de los ratones carentes de p53 tumores en los 6 primeros meses de edad (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994).

2.2.- Regulación de p53.

Dado el importante papel que juega la proteína p53 en la regulación de las principales funciones celulares, su expresión y activación en respuesta a señales de estrés se encuentra estrictamente regulada a múltiples niveles, desde la transcripción del locus y la traducción del ARNm que da lugar a la proteína, a las modificaciones postraduccionales que sufre p53 para ser activada, pasando por su estabilidad, su localización subcelular y su interacción con otras proteínas (Hayon y Haupt, 2002; Toledo y Wahl, 2006; Millau et al., 2009; Kruse y Gu, 2009).

Uno de los principales mecanismos de regulación de p53 es su degradación proteolítica, que es llevada a cabo gracias a la interacción con Mdm2 (*Murine double minute 2*), su regulador negativo mejor conocido. Mdm2 es una E3 ubiquitin ligasa capaz de interaccionar con p53 a través de su dominio de transactivación y de ubiquitinar a la proteína señalizándola para su degradación por la vía del proteasoma. Mdm2 es también una diana transcripcional de p53, por lo que se establece un bucle regulador entre las dos proteínas: la expresión de Mdm2 depende de la activación de p53 la cual a su vez depende de Mdm2. La gran importancia de esta vía de regulación queda reflejada en los modelos animales deficientes en Mdm2; éstos presentan letalidad embrionaria debido a un aumento de la apoptosis inducida por p53; este fenotipo se recupera al eliminar también p53 (Hayon y Haupt, 2002; Iwakuma y Lozano, 2003; Toledo y Wahl, 2006; Millau et al., 2009).

Otro de los aspectos más importantes de la regulación de p53 radica en las modificaciones postraduccionales que sufre la proteína; entre ellas cabe destacar la fosforilación de residuos de serina y treonina, y la acetilación, ubiquitinación y sumoilación de residuos de lisina (Bode y Dong, 2004).

La fosforilación es uno de los principales mecanismos de estabilización y activación de p53 tras estímulos de estrés; así se ha visto que la proteína quinasa ATM es capaz de fosforilar p53 en respuesta a daño en el ADN causado por radiación gamma, mientras que la quinasa ATR es responsable de la fosforilación de p53 tras radiación por UV-C (Siliciano et al., 1997; Attardi et al., 2004; Kurz y Lees-Miller, 2004). Inicialmente se consideraron los residuos de serina localizados en el extremo amino-terminal de la proteína como los más relevantes en el proceso de estabilización de p53, ya que al ser fosforilados impiden la

interacción entre Mdm2 y p53, y por tanto su degradación; sin embargo, estudios *in vivo* han demostrado que estos residuos no son esenciales para la estabilización de la proteína. La existencia de múltiples aminoácidos potencialmente fosforilables indica que este es un proceso redundante necesario para asegurar la correcta regulación de p53 en respuesta a diferentes estímulos de estrés (Toledo y Wahl, 2006; Kruse y Gu, 2009).

Otra de las modificaciones postraduccionales más importante para la correcta activación de p53 es la acetilación de residuos de lisina llevada a cabo, entre otras, por las proteínas CBP y p300 (Grossman, 2001). Estos aminoácidos están localizados en el extremo carboxi-terminal de la proteína y son residuos susceptibles de ubiquitinación por Mdm2, de manera que ambas modificaciones son mutuamente excluyentes y el balance entre una y otra afecta a la estabilidad de p53. Sin embargo, estudios *in vivo* han demostrado que esta regulación es más compleja y que más residuos de lisina, así como otras E3 ubiquitin ligasas diferentes a Mdm2 deben estar implicadas en la estabilidad de p53 (Toledo y Wahl, 2006; Kruse y Gu, 2009).

La actividad de p53 está regulada también a nivel de su localización subcelular. Ésta viene determinada por las modificaciones postraduccionales que sufre la proteína así como por su interacción con otras proteínas. Mdm2 regula también la localización subcelular de p53, se ha descrito que la proteína monoubiquitinada es exportada del núcleo y se acumula en el citoplasma donde, además de ser degradada por la vía del proteasoma, puede localizarse en la mitocondria e inducir apoptosis, o puede regular procesos de autofagia. p53 interacciona también con otras proteínas citoplasmáticas, como Cul9, implicadas en mantener a la proteína p53 en el citoplasma (O'Brate y Giannakakou, 2003; Kruse y Gu, 2009; Millau et al., 2009).

Las modificaciones postraduccionales de p53 así como su interacción con diversos cofactores, determinan el reconocimiento de los promotores de sus genes diana y, por tanto, la especificidad de la respuesta mediada por esta proteína. Así por ejemplo se ha visto que la fosforilación de la serina 46 favorece la transactivación de genes proapoptóticos (NOXA, Dr5, PUMA) sin afectar la expresión de p21^{CIP1}; mientras que la acetilación de la lisina 120 en respuesta a daño en el ADN es crucial para la apoptosis dependiente de p53 y dispensable para la parada de proliferación celular (Mellert et al., 2007; Das et al., 2008).

Existen proteínas capaces de activar y estabilizar a p53 liberándola de su interacción con Mdm2; entre estas proteínas cabe destacar el supresor tumoral ARF (*Alternative Reading Frame*) denominado p14ARF en humano y p19ARF en ratón. En condiciones normales los niveles de ARF son bajos, cuando las células son expuestas a estímulos mitogénicos inadecuados, bien por activación de oncogenes o por crecimiento en condiciones subóptimas, sus niveles aumentan. ARF es capaz de interaccionar con Mdm2 y secuestrarlo al nucléolo,

favoreciendo así la estabilización y activación de p53 (Weber et al., 1999). ARF es esencial para la respuesta antiproliferativa mediada por p53 en respuesta a la activación del oncogén Ras (Palmero et al., 1998), la respuesta proapoptótica inducida por la activación del oncogén Myc o la oncoproteína viral E1A (Zindy et al., 1998; De Stanchina et al., 1998), o la proliferación limitada en cultivo de células primarias (Sherr y Weber, 2000; Sherr, 2001), aunque no se encuentra implicada en respuesta a estrés genotóxico (Gil y Peters, 2006; Kim y Sharpless, 2006).

3.- Conexión entre ING1b y p53.

Numerosas evidencias sugieren la existencia de una relación funcional entre las proteínas ING y el supresor tumoral p53. Se ha descrito que todos los miembros de la familia de proteínas ING, excepto ING3, son capaces de interaccionar físicamente con p53 en ensayos de sobreexpresión de ambas proteínas (Garkavtsev et al., 1998). Por otra parte ING1b se ha relacionado con la activación de p53: se ha descrito que ING1b es capaz de promover la estabilización y acumulación de p53 compitiendo con Mdm2 por la unión de p53 (Leung et al., 2002); además, de acuerdo con su relación con enzimas acetilasas y deacetilasas, se ha descrito que ING1b es capaz de inducir la acetilación de p53 en diversos residuos de lisina bien inhibiendo la deacetilasa Sir2 o bien mediante su interacción con las acetilasas CBP, p300 o PCAF (Kataoka et al., 2003). Por otro lado, se ha propuesto que ING1b puede actuar como cofactor transcripcional de p53 así se ha descrito que la expresión ectópica de ING1b induce la expresión de dianas transcripcionales de p53 como p21^{CIP1}, Mdm2 o BAX (Garkavtsev et al., 1998; Cheung y Li, 2002; Zhu et al., 2006; González et al., 2006). Sin embargo, no se ha establecido ninguna relación entre los niveles de expresión de ING1b y la expresión de p53 (Cheung et al., 2000).

Existen datos que indican que es necesaria la presencia de p53 funcional para que ING1b pueda llevar a cabo sus funciones. Se ha descrito que en ausencia de p53 la sobreexpresión de ING1b no induce una parada de la proliferación celular en fibroblastos primarios (González et al., 2006; Menéndez et al., 2009). Otros ensayos muestran que ING1b tampoco es capaz de inducir una respuesta apoptótica tras radiación UV en ausencia de p53 (Cheung y Li, 2002). Ensayos en líneas celulares derivadas de tumores indican que p53 coopera con ING1b para que se produzca una respuesta apoptótica en estas células tras tratamientos con agentes citotóxicos, confirmando una relación funcional entre ambas proteínas (Shinoura et al., 1999; Coles y Jones, 2009).

Sin embargo, también existen evidencias contrarias a una relación funcional entre ambas proteínas. Se ha descrito que la sobreexpresión de ING1b en células carentes de p53 induce una parada de la proliferación celular y una respuesta apoptótica tras el tratamiento con agentes citotóxicos (Tsang et al., 2003). Por otra parte, se ha descrito que ING1b es capaz de modular la expresión génica en ausencia de p53 (Goeman et al., 2005; Feng et al., 2006). Estudios con fibroblastos embrionarios obtenidos de animales deficientes en *Ing1* muestran un aumento en la proliferación celular independiente de p53 (Coles et al., 2007). Además, los animales deficientes en *Ing1* son susceptibles a la aparición de tumores fundamentalmente linfomas de células B, el hecho de que estos tumores sean diferentes a los descritos en animales p53-nulos apoya que ambos supresores tumorales pueden actuar de manera independiente (Kichina et al., 2006; Coles et al., 2007; Coles et al., 2008) (Figura 4).

Por lo tanto, la relación funcional entre estos dos supresores tumorales no está del todo clara y puede variar dependiendo del tipo celular, el tipo de daño o de la diana transcripcional activada en cada caso. Además, la mayoría de las evidencias tanto a favor como en contra de una relación funcional entre ambas proteínas se han obtenido de ensayos *in vitro* analizando respuestas celulares concretas en tipos celulares determinados, por lo que consideramos que sería interesante analizar la conexión entre ING1b y p53 en modelos más fisiológicos y a nivel de organismo.

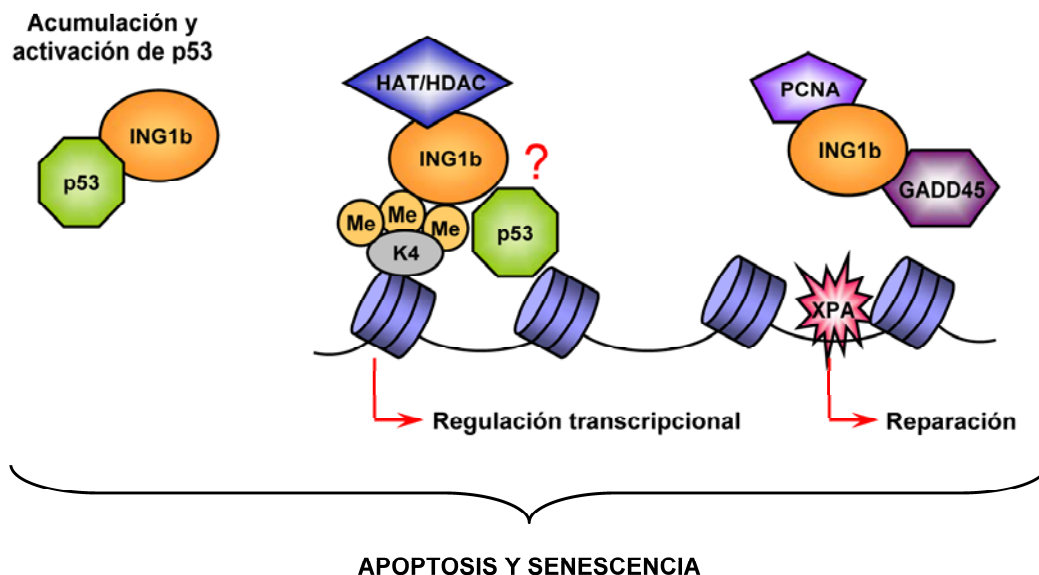


Figura 4: Representación esquemática de las funciones de ING1b y su relación con p53.

4.- Senescencia y supresión tumoral *in vivo*.

El proceso de senescencia celular se caracteriza por una parada permanente del ciclo celular; las células senescentes no responden a estímulos mitogénicos fisiológicos aunque son viables y permanecen metabólicamente activas. Estas células adquieren una serie de marcadores específicos tanto morfológicos como moleculares; las células senescentes se caracterizan por presentar una morfología extendida y plana, con un aumento en la vacuolización y un núcleo agrandado con gran número de nucléolos. El marcador de senescencia mejor conocido es la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal, *Senescence-Associated β -Galactosidase Activity*) detectable mediante tinción histológica en la mayoría de las células senescentes; proteínas como p15INK4b, DcR2 y DEC1 se han identificado también como marcadores de senescencia tanto *in vivo* como *in vitro* (Dimri et al., 1995; Collado y Serrano, 2006).

Inicialmente, el proceso de senescencia celular se describió como un fenotipo asociado a la acumulación de divisiones celulares y como consecuencia de la disfunción telomérica (senescencia replicativa), posteriormente se ha demostrado que este fenómeno también puede ser inducido por diversos estímulos como estrés oxidativo, daño en el ADN o activación de oncogenes (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007). La senescencia inducida por señales no teloméricas se denomina senescencia prematura.

Diversos estudios han demostrado la implicación del proceso de senescencia prematura en supresión tumoral. A nivel molecular, la senescencia se encuentra regulada por las vías de los supresores tumorales p53 y Rb; la pérdida de estos supresores tumorales es esencial para que se produzca la transformación oncogénica *in vitro*, aunque la importancia relativa de cada una de estas vías depende del tipo celular analizado y de la especie a la que pertenece. Por otra parte, se ha descrito que la capacidad de las células de escapar a la parada proliferativa característica de la senescencia celular es un requisito imprescindible para la transformación oncogénica *in vitro* (Drayton y Peters, 2002).

La existencia de esta respuesta celular a nivel de organismo y su posible relevancia como barrera antitumoral ha sido descrita recientemente gracias a la utilización de diversos modelos de tumorigénesis en los que la activación de oncogenes como K-Ras, N-Ras o B-Raf, o la pérdida de supresores tumorales como PTEN, desencadenan una respuesta senescente *in vivo* (Braig et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Chen et al., 2005). Así por ejemplo se han identificado células senescentes en lesiones benignas de piel (papilomas) inducidas mediante carcinogénesis química, o en nevus con mutaciones en el oncogen B-Raf, entre otros (Collado et al., 2005; Yu et al., 2009). La identificación de células con marcadores senescentes en lesiones benignas, pero no en tumores malignos, indica que el proceso de senescencia celular juega un importante papel en supresión tumoral *in vivo*. Por otra parte, las

vías de señalización responsables de la regulación de esta respuesta celular *in vitro* se encuentran frecuentemente alteradas en tumores humanos (revisado en Mooi y Peeper, 2006; Collado et al., 2007; Courtois-Cox et al., 2008).

Se han propuesto múltiples mecanismos como responsables de la inducción de la respuesta senescente *in vivo*. Por una parte, se ha propuesto que la senescencia inducida por oncogenes se debe a la acumulación de daño en el ADN (respuesta DDR: DNA Damage Response), otro de los estímulos capaces de inducir senescencia prematura. La activación oncogénica induce en primer lugar una proliferación excesiva en las células que puede generar daño en el ADN como consecuencia de una replicación aberrante, el reconocimiento de estas lesiones y la activación de las quinasas ATM y ATR conducirá a la inducción de una respuesta senescente. También se ha descrito que el estrés oncogénico produce un aumento en los niveles de radicales libres de oxígeno, potentes agentes genotóxicos capaces de inducir senescencia por activación de la vía de proteínas quinasas p38 y PRAK, implicadas en la fosforilación y activación de p53. Sin embargo, existe cierta controversia sobre la importancia de la respuesta DDR en supresión tumoral *in vivo* ya que no todos los oncogenes inducen daño en el ADN (Hemann y Narita, 2007); además, existen estudios en modelos de ratón en los que se demuestra que la respuesta DDR no es responsable de suprimir el desarrollo tumoral en respuesta a la activación de oncogenes (Efeyan et al., 2006; Christophorou et al., 2006). El proceso de senescencia celular se ha relacionado también con cambios en la estructura de la cromatina asociados a cambios en la expresión génica. Múltiples evidencias apoyan que la senescencia es un proceso regulado epigenéticamente, así se ha descrito que durante el proceso de senescencia inducida por oncogenes se produce la aparición de nuevas estructuras de heterocromatina en fibroblastos primarios humanos (Courtois-Cox et al., 2008; Menéndez et al., 2009).

La senescencia inducida por oncogenes es por tanto uno de los mecanismos que ha desarrollado el organismo como barrera antitumoral. La activación de esta respuesta celular en lesiones premalignas supone un bloqueo proliferativo que impide la progresión a tumores malignos. Como se ha comentado anteriormente, la proteína ING1b se ha relacionado con el proceso de senescencia en diversos ensayos *in vitro*, dada su implicación en los distintos mecanismos responsables de regular esta respuesta celular, así como su posible relación con el supresor tumoral p53, consideramos interesante analizar su participación en la inducción de esta respuesta celular *in vivo*, y su conexión con supresión tumoral.

Para analizar el efecto de la proteína ING1b en un modelo más fisiológico, hemos utilizado un modelo animal de deficiencia en el locus *Ing1*. Gracias al estudio del efecto de la pérdida de *Ing1* en diversas respuestas celulares mediadas por p53 hemos analizado la relación funcional entre ambas proteínas así como la relevancia de esta conexión en las funciones de p53. Dada la implicación descrita de ING1b en represión transcripcional y su relación con la transactivación de genes diana de p53, hemos analizado el efecto de la ausencia de *Ing1* en la expresión de diversas dianas transcripcionales de p53 así como su activación en respuesta a estímulos de estrés. Por otra parte, mediante la utilización de diversos modelos de carcinogénesis química en animales deficientes en *Ing1* hemos analizado la implicación de este locus en supresión tumoral *in vivo*. Por último, hemos aprovechado la estrategia utilizada para la generación de este modelo animal deficiente en el locus *Ing1* para desarrollar una herramienta que nos permita encontrar nuevos posibles reguladores del locus *Ing1* de ratón.

Objetivos.

1. Analizar la implicación de *Ing1* en respuestas mediadas por p53, a nivel celular y de organismo, utilizando modelos animales de deficiencia en el locus *Ing1*.
2. Caracterizar el papel de *Ing1* como supresor tumoral *in vivo*, analizando el fenotipo tumoral de animales deficientes en el locus *Ing1*.
3. Identificar posibles reguladores de *Ing1* utilizando como herramienta células portadoras de un casete *gene-trap* en el locus *Ing1*.

Materiales y Métodos.

1.- Cultivos celulares.

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs: *Mouse Embryonic Fibroblast*) de genotipo silvestre y deficientes en *Ing1* se obtuvieron a partir de embriones de fondo genético 129Sv/Pas de día 13,5 de desarrollo, siguiendo el protocolo previamente descrito (Palmero y Serrano, 2001).

Para los ensayos de infección retroviral se utilizaron, como células empaquetadoras de retrovirus, la línea 293T de células epiteliales de riñón humano, que expresan el antígeno T del virus SV40.

Para la derivación de líneas celulares a partir de fibrosarcomas, los tumores se trocearon y los fragmentos se dispusieron en frascos de 25 cm² con medio de cultivo normal. Una vez obtenidas las células de los tumores, se expandieron y congelaron.

Las células se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*, Gibco) inactivado por calor, y antibióticos (50 U/ml de penicilina y 0,05 mg/ml de estreptomicina). Los cultivos se mantuvieron en incubadores con una atmósfera de 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

1.1.- Determinación de la tasa de síntesis de ADN.

El ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) se llevó a cabo como se describe en (González et al., 2006) con ligeras modificaciones. Los MEFs se plaquearon en portaobjetos de cristal de LabTek (30.000 células por pocillo, en cámaras de 8 pocillos), 24 horas después se les administró un pulso de 6 horas de BrdU a una concentración final de 10 µM. Pasado ese tiempo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con 0,1% Tritón X100 en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, se incubaron con 2M HCl 5 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con 2% BSA en PBS toda la noche a 4°C. La detección de las células BrdU positivas se realizó mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-BrdU (BP40250 de Megabase Research Products) a una dilución 1:1000 y un anticuerpo secundario Alexa 488-Rabbit a una dilución 1:500. Para el montaje de la inmunofluorescencia se utilizó medio de montaje Vectashield con DAPI para la visualización de los núcleos.

En el caso de las células sometidas a estrés genotóxico, las células fueron tratadas con adriamicina (0,2 µg/ml) o UV-C (40 J/cm²) 24 horas antes del pulso con BrdU.

El porcentaje de células BrdU positivas se determinó contando al menos 200 células en cada caso.

1.2.- Protocolo de pases seriados 3T3.

MEFs de pase temprano de los genotipos indicados se plaquearon a una densidad de 175.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Cada tres días se tripsinizaron las células, se contaron y se volvieron a plaquear a la misma densidad. El número de divisiones se calculó utilizando la fórmula $PDL=3,32(\log N_f - \log N_i)$, donde N_i es el número de células sembradas y N_f el número de células recogidas para cada punto.

1.3.- Ensayos de supervivencia celular.

Para los ensayos de supervivencia a estrés genotóxico, MEFs de los genotipos indicados se plaquearon a una densidad de 4.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos, por duplicado. 24 horas después, se les administraron los diferentes tratamientos: en los ensayos con UV-C se retiró el medio de la placa antes de someter a las células a diferentes dosis de radiación UV-C (254 nm) en un aparato stratalinker (Stratagene); en los ensayos con adriamicina (Farmiblastina, Pfizer) ésta fue añadida al medio de las células a diferentes concentraciones finales. 24 horas después de los tratamientos, se analizó la tasa de supervivencia celular. Las células fueron fijadas con 1% glutaraldehído en H₂O durante 10 minutos a 4°C y se tiñeron con 0,1% cristal violeta en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente; tras lavar y dejar secar las placas, los precipitados de cristal violeta se disolvieron en 10% acético y se midió la densidad óptica a 590 nm.

Para las curvas de selección de MEFs inmortalizados se plaquearon 10.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se trataron durante 14 días con diferentes concentraciones de neomicina (G-418, Gibco). Posteriormente las células se fijaron con formaidehído y se tiñieron con Giemsa 1:20 en PBS.

1.4.- Infección retroviral.

El protocolo de infección retroviral se realizó básicamente como se describe en (Palmero y Serrano, 2001) con ligeras modificaciones. Se utilizaron los vectores retrovirales pLPC y pLPC-RasV12 para analizar la respuesta celular a estrés oncogénico, pBABEzeoLT+ST para la inmortalización de MEFs y pPuro-MarXII para el ensayo de búsqueda de reguladores de *Ing1*. Para la producción de virus las células 293T fueron cotransfectadas, de forma transitoria mediante la técnica de fosfato cálcico, con 10 µg del vector retroviral de interés y 10 µg del vector pCLEco que expresa los genes virales gag, pol y env^{ECO}. Tras 48 horas se recogió el sobrenadante de las células 293T, se filtró con un filtro de 0,45 µm, se diluyó 1:2 con medio fresco y se añadió polibreno a una concentración final de 8 µg/ml. Este sobrenadante se utilizó como medio de cultivo de MEFs de los genotipos indicados plaqueados el día anterior a una densidad de 800.000 células por placa de 10 cm.

Este procedimiento se repitió a las 12 horas utilizando una concentración de polibreno de 4 µg/ml y a las 24 horas con una concentración de polibreno de 8 µg/ml. Tras un día de recuperación con medio fresco, las células fueron seleccionadas con puromicina a una concentración de 2 µg/ml durante 3 días, o zeocina a una concentración de 300 µg/ml durante 7 días.

1.5.- Ensayo de búsqueda de reguladores de *Ing1*.

El ensayo de búsqueda de reguladores de *Ing1* se llevó a cabo básicamente como se describe en (Artero-Castro et al., 2009). Brevemente, MEFs inmortalizados heterocigotos para el casete *gene-trap* fueron infectados con una librería retroviral de células madre embrionarias de ratón clonada en el vector retroviral pPuro-MarXII, cedida por la Dra. Matilde Lleónart, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona. El ensayo se realizó con dos preparaciones independientes de MEFs. Las células infectadas fueron plaqueadas a una densidad de 100.000 células por placa de 10 cm, por triplicado, y seleccionadas con dos concentraciones de neomicina (G-418 Gibco), 2 y 3 mg/ml, durante dos semanas. Los clones obtenidos se picaron, expandieron y congelaron. Como control se llevaron en paralelo MEFs inmortalizados de genotipo silvestre y homocigotos para el casete *gene-trap*.

2.- Ensayos con animales.

2.1.- Generación de ratones deficientes en *Ing1*.

Los ratones fueron generados en el laboratorio del Dr. Ernst-Martin Füchtbauer, Universidad de Aarhus, Dinamarca. En un abordaje a nivel global de inactivación génica en ratón, células madre embrionarias (ES) de ratón (TBV-2) fueron electroporadas con el vector pT1ATGβGeo que contiene un casete β-geo compuesto por un sitio aceptor de procesamiento seguido de la fusión sin promotor de un gen reportero (β-galactosidasa) y un marcador de selección (gen de resistencia a Neomicina). El sitio de integración del vector se identificó utilizando RACE y secuenciación. Un clon de células ES con una copia del casete insertado en el locus *Ing1* se utilizó para la generación de quimeras mediante microinyección en blastocistos. Las quimeras con transmisión por vía germinal se cruzaron para obtener ratones con alelos *Ing1* modificados. Los animales deficientes en *Ing1* se estabularon en habitaciones ventiladas, esterilizadas y con condiciones de luz, temperatura, humedad, comida y agua controladas. Los animales se mantuvieron en un fondo genético 129Sv/Pas.

2.2.- Animales transgénicos Tyr::N-Ras^{Q61K} deficientes en *Ing1*.

Los ratones Tyr::N-Ras^{Q61K} fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Friedrich Beermann, ISREC, Suiza (Ackermann et al., 2005). Los animales nulos para el locus *Ink4a/Arf* fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Manuel Serrano, CNIO, Madrid (Serrano et al., 1996). Para la generación de los animales transgénicos para Ras y deficientes en *Ing1*, se realizaron cruces entre animales con una copia del transgen Tyr::N-Ras^{Q61K} y animales homocigotos para el casete *gene-trap* en el locus *Ing1*, los ratones transgénicos resultantes de estos cruces se utilizaron como fundadores de la colonia. Estos animales se mantuvieron en un fondo mixto 50% C57BL/6 y 50% 129Sv/Pas.

Para la generación de los animales transgénicos para Ras y carentes del locus *Ink4a/Arf*, animales de la colonia anterior con una copia del transgen Tyr::N-Ras^{Q61K} y silvestres para el locus *Ing1* (Tyr-wt) fueron cruzados con animales nulos para el locus *Ink4a/Arf*, los ratones transgénicos resultantes de estos cruces se utilizaron como fundadores de la colonia. Estos animales se mantuvieron en un fondo mixto 75% C57BL/6 y 25% 129Sv/Pas.

Todos los animales se estabularon en habitaciones ventiladas, esterilizadas y con condiciones de luz, temperatura, humedad, comida y agua controladas. Los animales se analizaron visualmente una vez por semana para detectar la aparición de melanomas. Los ratones moribundos o con lesiones superiores a 2 cm se sacrificaron por dislocación cervical. Las lesiones se mantuvieron en formol para su posterior análisis histopatológico.

2.3.- Protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón.

Se establecieron grupos de 10 animales por genotipo, de entre 2 y 4 meses de edad. Dos días antes del comienzo del protocolo, se afeitó el lomo de los animales. Los ratones recibieron, de forma tópica, una única dosis de 32 µg de DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno, Sigma) disuelto en 200 µl de acetona, y un tratamiento de dos dosis semanales de 12,5 µg de TPA (forbol 12-miristato 13-acetato, Sigma) disuelto en 200 µl de acetona, durante 16 semanas. La medición de los tumores se realizó con un calibre. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y las lesiones recogidas fueron congeladas directamente en nitrógeno líquido o conservadas en formol para su posterior estudio.

2.4.- Respuesta inflamatoria a TPA.

Se establecieron grupos de cuatro animales por genotipo, de entre 2 y 4 meses de edad. Dos días antes de la administración del tratamiento se afeitó parte del lomo de los animales. En la zona afeitada se les administró, de forma tópica, una única dosis de 12,5 µg

de TPA (forbol 12-miristato 13-acetato, Sigma) disuelto en 200 μ l de acetona. 30 horas después del tratamiento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomaron muestras de piel de la zona tratada con TPA y de una zona sin tratar. Las muestras fueron congeladas directamente en nitrógeno líquido o conservadas en formol para su posterior estudio.

2.5.- Ensayo de formación de fibrosarcomas.

Se establecieron grupos de 20 animales por genotipo, de entre 2 y 4 meses de edad. A los animales se les inyectó intramuscularmente, en el muslo izquierdo, una única dosis de 1 mg de 3-metilcolantreno (Sigma) disuelto en 40 μ l de aceite de sésamo (Sigma). Se monitorizó la aparición de fibrosarcomas realizando mediciones semanales del muslo de los animales. Se consideró fibrosarcoma a tumores de tamaño igual o superior a 1,5 cm; los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron los 2 cm de tamaño. Los tumores fueron congelados directamente en nitrógeno, guardados en formol o utilizados para la derivación de líneas celulares.

2.6.- Ensayo de tumorigénesis en ratones desnudos nu/nu.

Se utilizaron dos líneas celulares derivadas de fibrosarcomas de cada genotipo indicado. 150.000 células resuspendidas en 100 μ l de PBS se inyectaron subcutáneamente en el costado de animales nu/nu. De cada línea celular se realizaron 4 inyecciones independientes en diferentes ratones. Se monitorizó la aparición y crecimiento de los tumores realizando mediciones semanales.

2.7.- Análisis de expresión génica.

Animales de los diferentes genotipos fueron irradiados con una única dosis de radiación gamma (5Gy). 6 horas después tanto los animales irradiados como ratones controles sin irradiar fueron sacrificados; los órganos de los animales se congelaron directamente en nitrógeno líquido después de su extracción. Para la obtención de ARN total los órganos se homogeneizaron congelados, utilizando un politrón, en 1 ml de Tri Reagent (Sigma); se siguió el protocolo de la casa comercial hasta la separación de las diferentes fases. La fase acuosa, conteniendo el ARN, se mezcló con etanol 70%. La extracción del ARN se prosiguió utilizando el kit RNeasy Mini (Quiagen) y siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico se realizó un paso de digestión con DNasa (Quiagen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La integridad del ARN se comprobó mediante análisis en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent

Technologies). Se usó 1 µg de ARN total para sintetizar ADNc utilizando el kit RT² First Strand (SABiosciences) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Se analizó la expresión de 84 genes implicados en las vías de señalización de p53 utilizando el sistema RT² profiler PCR Array System (SABiosciences) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en un aparato Applied Biosystems 7300. Estos ensayos se realizaron con dos animales de cada genotipo y condición (irradiados y sin irradiar); para el análisis de la expresión génica utilizamos una mezcla de ARN de ambos animales (0,5 µg de ARN de cada animal).

3.- Métodos bioquímicos.

3.1.- Inmunoblot o *Western-blot*.

El análisis de la expresión de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Inmunoblot o *Western-blot*. La preparación de los lisados celulares totales se realizó en tampón de sal media con inhibidores de proteasas como se describe en (Pantoja y Serrano, 1999). La extracción de proteína de muestras animales (tumores y órganos) se realizó homogeneizando las muestras en tampón de alta sal (RIPA: 0,02% azida, 50 mM Tris HCL pH 7,5, 0,5% deoxicolato, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS) suplementado con inhibidores de proteasas. Tras la homogenización, las muestras de animales se procesaron igual que las de cultivos celulares. La cuantificación de la cantidad de proteína se realizó mediante la técnica de Lowry (Lowry Protein Assay, BioRad). Entre 20-30 µg de los lisados se resolvieron en geles SDS-Page de acrilamida-bisacrilamida (40% BioRad), con una fracción separadora al 12%. Tras la electroforesis, los geles de transfirieron a membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,2 µm (BioRad) mediante transferencia húmeda durante 1 hora a 200 mA. Posteriormente las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBS-Tween 0,2% durante al menos 1 hora.

Para la detección de las proteínas las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla1) diluidos en leche al 5% en PBS-Tween 0,2% durante al menos 2 horas. Tras tres lavados con PBS-Tween 0,2%, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa (Tabla 2) y diluido en leche al 5% en PBS-Tween 0,2% durante 1 hora. Tras tres lavados con PBS-Tween 0,2%, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia con ECL (Amersham).

3.2.- Inmunoprecipitación.

Para cada ensayo de inmunoprecipitación se incubó 1 mg de extracto proteico, preparado y cuantificado como se describe en el apartado anterior, con 5 µg de anticuerpo anti-p53 conjugado a agarosa (Santa Cruz sc-6243) toda la noche a 4°C con rotación constante. A continuación las muestras se lavaron 4 veces con tampón de lisis frío y las bolas de agarosa se incubaron en 20 µl de tampón de carga 2XSDS conteniendo 100 mM iodoacetamida (Merk) 5 minutos a 95°C para separar las proteínas. Los inmunocomplejos se resolvieron en geles SDS-Page de acrilamida-bisacrilamida (40% BioRad), con una fracción separadora al 12% procesados como se describe en el apartado anterior.

PROTEÍNA	ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
ING1b	LG-1	Policlonal conejo	1:1000	Generado en el laboratorio
p53	CM5	Policlonal conejo	1:500	Novocastra NCL-p53-CM5
Acetil-p53 Lys 379	2370	Policlonal ratón	1:200	Trevigen 2370-PC-050
Fosfo-p53 Ser15	16G8	Monoclonal ratón	1:500	Cell Signaling 9286
p21 ^{CIP1}	C-19	Policlonal cabra	1:500	Santa Cruz sc-397
β-actina	AC-15	Monoclonal ratón	1:10000	Sigma A5441

Tabla 1: Lista de anticuerpos primarios utilizados en este trabajo.

ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-Ig ratón	Policlonal cabra	1:5000	DAKO P 0447
Anti-Ig conejo	Policlonal burro	1:5000	Amersham NA934
Anti-Ig cabra	Policlonal conejo	1:3000	DAKO P 0160

Tabla 2: Lista de anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo.

3.3.- RT-PCR y PCR cuantitativa

La extracción de ARN total de células y tumores se llevó a cabo utilizando el método Tri Reagent (SIGMA). Las muestras de tumores, congeladas en nitrógeno líquido en el momento de la extracción, se homogeneizaron utilizando un politrón. Se utilizaron 2 µg de ARN total para sintetizar ADNc utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega). 1 µl de esta reacción fue utilizado para llevar a cabo reacciones estándar de PCR o PCR cuantitativa.

Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un aparato de Applied Biosystems, 7900HT Fast. Los oligonucleótidos utilizados se recogen en la tabla 3.

ENSAYO	PRODUCTO AMPLIFICADO	OLIGONUCLEOTIDOS
Análisis de la expresión de transcritos del locus <i>Ing1</i>	Transcrito <i>Ing1a/2</i>	<i>Ing1</i> exón1a directo: 5'-CCTTCTCGTCCAGATTGG-3'
		<i>Ing1</i> exón2reverso: 5'-CTACCTGTTGTAAGCCC-3'
	Transcrito <i>Ing1b/2</i>	<i>Ing1</i> exón1b directo: 5'-ATGTTGAGTCCTGCCAACGG-3'
		<i>Ing1</i> exón2reverso: 5'-CTACCTGTTGTAAGCCC-3'
	Transcrito <i>Ing1c/2</i>	<i>Ing1</i> exón1c directo: 5'-ATCGCTTGTCGCGTTTCC-3'
		<i>Ing1</i> exón2reverso: 5'-CTACCTGTTGTAAGCCC-3'
	<i>Ing2</i>	<i>Ing2</i> directo: 5'-CAGCAGCAGCTGTACTCG-3'
		<i>Ing2</i> reverso: 5'-ATCACAGTCGTCAATCCCG-3'
	Casete <i>gene-trap</i>	<i>Ing1</i> exón1b directo: 5'-ATGTTGAGTCCTGCCAACGG-3'
		β -Geo reverso: 5'-GATGTGCTGCAAGGCGATTA-3'
	Actina	Actina directo: 5'-TTGTAACCAACTGGGACGACATGG-3'
		Actina reverso: 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3'
Estudio de mutaciones en papilomas y carcinomas	p53	p53 directo: 5'-TTATGGAAACTCCTTCCTCCAGAAG-3'
		p53 reverso: 5'-CGTTTACGCCCGCGGATCTTGAGGGTG-3'
	H-Ras	H-Ras directo: 5'-GAAAGAGTGCCCTGACCATCC-3'
		H-Ras reverso: 5'-GGTCTTGGCTGATGTTTCAAT-3'
Búsqueda de reguladores del locus <i>Ing1</i>	pPuro-MarXII	pPuro-MarXII directo: 5'-GGAGACCCAAGCTTGGTACC-3'
		pPuro-MarXII reverso: 5'-CTACAGGTGGGGTCTTTCAT-3'

Tabla 3: Lista de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

3.4.- Inmunohistoquímica.

Esta técnica se realizó en colaboración con el laboratorio de la Dra. Juana María Flores, UCM, Madrid. Las muestras recogidas en formol se fijaron en parafina para la

realización de los cortes. Las muestras destinadas a tinción con hematoxilina/eosina se tiñeron en este paso. Las muestras destinadas a tinción inmunohistoquímica fueron desparafinadas y rehidratadas con incubaciones seriadas en xilol y etanol a concentraciones decrecientes. El desenmascaramiento de epítomos se realizó en olla a presión con tampón citrato pH 6 durante 2 minutos. Para analizar la proliferación celular, las muestras se incubaron con un anticuerpo anti-Ki67 (clon SP6, Thermo scientific) a una dilución 1:200 en TBS toda la noche a 4°C. Para analizar la expresión de ING1b, previo a la incubación con el anticuerpo primario se realizó un paso de inhibición de la peroxidasa endógena (15 minutos de incubación en 100 ml metanol con 1,5 ml peróxido de hidrógeno) y un paso de bloqueo de uniones inespecíficas (30 minutos de incubación con suero inespecífico (Anti-Ig cabra, DAKO) a una dilución 1:20 en TBS), como anticuerpo primario en estas tinciones se utilizó el suero LG1 a una dilución 1:2500 en TBS, la incubación se realizó durante toda la noche a 4°C. La detección de la señal se realizó de la misma manera para los dos anticuerpos: las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (Anti-Ig conejo, Vector) a una dilución 1:400 en TBS durante 30 minutos, a continuación se incubaron con estreptavidina (Invitrogen) a una dilución 1:400 en TBS durante 30 minutos, el revelado se realizó incubando las muestras 10 minutos con diaminobencidina (Vector). Las muestras se contrastaron con hematoxilina (4 minutos de tinción) y se deshidrataron con incubaciones seriadas en concentraciones crecientes de etanol y xilol. Para el montaje de las muestras se utilizó DEPEX. Las muestras se analizaron en un microscopio Nikon 90i.

Resultados.

1.- Caracterización de un modelo de deficiencia en *Ing1*.

El primer paso en el desarrollo de este trabajo fue la caracterización de un modelo animal de pérdida de función del supresor tumoral ING1b. Gracias a la colaboración con el laboratorio del Dr. Ernst-Martin Füchtbauer (Universidad de Aarhus, Dinamarca) obtuvimos un modelo animal deficiente para el locus *Ing1* de ratón generado mediante la metodología de trampa génica (*gene-trap*). Esta metodología consiste en la inserción, al azar, en el genoma, de un casete formado por un fuerte aceptor de procesamiento de ARNm (procesamiento de splicing, AS), seguido de una fusión sin promotor del gen reportero β -galactosidasa y el gen de resistencia a Neomicina (β -Geo) y finalmente una cola poli-A. La inserción del casete en un locus interrumpe el procesamiento normal del mismo, generando transcritos truncados consecuencia del procesamiento de los exones situados en 5' del casete con el casete *gene-trap* (Stanford et al., 2006).

El locus *Ing1* de ratón consta de 4 exones (1a, 1b, 1c y 2) que dan lugar a tres transcritos distintos como consecuencia del procesamiento alternativo de su ARNm. En nuestro caso, la inserción del casete *gene-trap* se produjo en el intrón comprendido entre los exones 1b y 1c; a 67 pares de bases del comienzo del exón 1c (Figura 5A). Como primer paso en la caracterización de este modelo analizamos la expresión de los diferentes transcritos del locus mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativa con oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos. Este análisis se realizó en fibroblastos embrionarios obtenidos a partir de ratones silvestres (MEFs *wild type*, wt) o de ratones en los que el casete *gene-trap* se encuentra introducido en uno (MEFs +/g) o en los dos alelos del locus (MEFs g/g). Observamos que la inserción del casete *gene-trap* en los dos alelos reduce de manera significativa la expresión de los transcritos 1a/2 y 1b/2; aunque no se produce una eliminación total de la expresión de estos transcritos debido al procesamiento residual de los transcritos silvestres alrededor del casete *gene-trap*. En el caso del transcrito 1c/2 la expresión se elimina completamente, esto es debido probablemente a la inserción del casete *gene-trap* en secuencias reguladoras necesarias para la transcripción del promotor del exón 1c. Para descartar que otros miembros de la familia pudieran estar compensando la ausencia de *Ing1*, analizamos la expresión de *Ing2*, el miembro de la familia más relacionado con *Ing1*; observamos que sus niveles no se ven afectados en las células *gene-trap* (Figura 5B). Ensayos de RT-PCR cuantitativa mostraron una reducción en los niveles de expresión del transcrito 1b/2 en los fibroblastos deficientes en *Ing1* de aproximadamente un 95% en comparación con los fibroblastos silvestres (datos no mostrados).

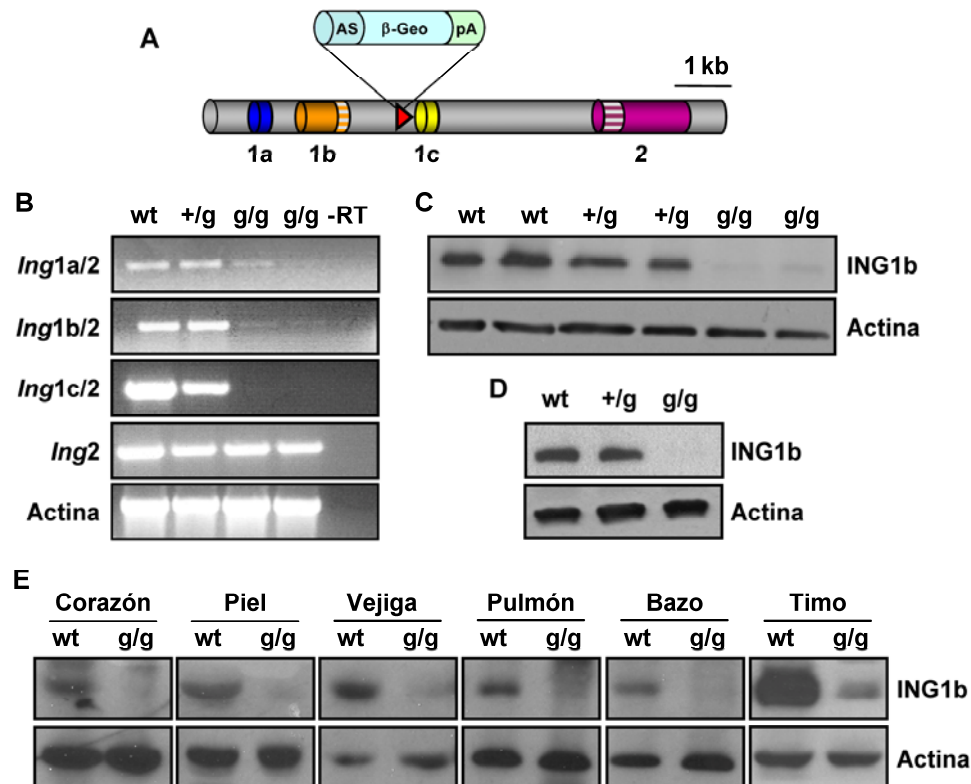


Figura 5: Expresión de los productos del locus *Ing1* en los MEF *gene-trap*. (A) Representación esquemática del locus *Ing1* de ratón, las regiones con secuencia codificante para proteína en los exones 1b y 2 se muestran rayadas, el sitio de integración del casete *gene-trap* se representa por una punta de flecha. (B) Análisis por RT-PCR de la expresión de los transcritos alternativos del locus *Ing1* tanto en MEFs de genotipo silvestre (wt) como heterocigotos (+/g) y homocigotos (g/g) para el casete *gene-trap*. (C, D, E) Análisis por *Western-blot* de la expresión de ING1b en MEFs (C), en extractos obtenidos de embriones de 13,5 días de desarrollo (D) y en órganos de animales adultos (E) de los genotipos indicados.

La traducción de los transcritos del locus *Ing1* de ratón da lugar a dos proteínas: ING1b (desde un ATG contenido en el exón 1b), e ING1c (desde un ATG interno en el exón 2) (Zeremski et al., 1999), aunque en nuestro laboratorio no hemos sido capaces de detectar la expresión de esta última. El análisis por *Western-blot* de la expresión de ING1b en fibroblastos embrionarios de los diferentes genotipos muestra una reducción considerable de los niveles de expresión de la proteína en los MEFs g/g, de manera consistente a lo observado en los ensayos de RT-PCR semicuantitativa (Figura 5C). La cuantificación de estos ensayos de *Western-blot* indicó una reducción de los niveles de proteína en un 75% respecto a los niveles normales (datos no mostrados).

Corroboramos estos resultados analizando la expresión de ING1b en extractos obtenidos directamente de los animales. Por una parte, analizamos los niveles de expresión de la proteína ING1b en extractos obtenidos de embriones, tanto silvestres como heterocigotos y homocigotos para el casete *gene-trap*, de día 13,5 de desarrollo. Como se muestra en la figura 5D, observamos una disminución de los niveles de ING1b en los

embriones g/g similar a la mostrada en los MEFs g/g. Por otra parte, estudiamos la expresión de la proteína ING1b en extractos generados a partir de diferentes órganos de ratones adultos, tanto de genotipo silvestre como deficientes en *Ing1*. Observamos que ING1b se expresa de forma ubicua en los órganos de animales silvestres adultos siendo su expresión mayor en timo. En los animales *gene-trap* observamos que la expresión de ING1b se encuentra disminuida en todos los órganos analizados (Figura 5E).

Estos datos demuestran que la inserción del casete *gene-trap* en el locus *Ing1* de ratón produce una drástica disminución de la expresión de los transcritos del locus así como de la proteína ING1b; y validan a las células y animales homocigotos para la inserción del casete *gene-trap* como un buen modelo para estudiar los efectos de la deficiencia de *Ing1*.

2.- Efecto de la deficiencia de ING1b en respuestas mediadas por p53.

2.1.- Estudio de los procesos de proliferación, immortalización y senescencia celular en fibroblastos embrionarios de ratón.

Como primer abordaje para estudiar el papel de ING1b en respuestas celulares mediadas por p53, decidimos analizar el efecto de la deficiencia de esta proteína a nivel celular; en concreto en fibroblastos embrionarios de genotipo silvestre o deficientes en ING1b. Elegimos este tipo celular por su fácil obtención y porque, dado que son células primarias, son un buen modelo para analizar los procesos de proliferación, immortalización y senescencia celular; así como otras respuestas mediadas por p53.

Con el fin de examinar si los fibroblastos embrionarios deficientes en ING1b presentan cambios en su velocidad de crecimiento respecto a MEFs silvestres analizamos, en primer lugar, su tasa de síntesis de ADN. Para ello sometidos a MEFs de pase temprano de los diferentes genotipos, en crecimiento asincrónico y no confluentes, a un pulso de bromodeoxiuridina (BrdU) durante 6 horas y posteriormente analizamos la tasa de incorporación de BrdU mediante inmunofluorescencia. Observamos que los MEFs g/g presentaban una tasa de síntesis de ADN similar a la obtenida en los MEFs wt (14,15% de células BrdU positivas en los MEFs wt frente a 17,15% de células BrdU positivas en los MEFs g/g) (Figura 6). Confirmamos este resultado analizando la velocidad de división de estas células mediante ensayos de curvas de crecimiento (datos no mostrados).

Para estudiar si la deficiencia en ING1b altera la entrada en senescencia o la immortalización de estas células, analizamos su crecimiento realizando un protocolo de pases

seriados 3T3. Como se muestra en la tabla 4, observamos que tanto los MEFs silvestres como los deficientes en ING1b entran en senescencia y se immortalizan de manera similar.

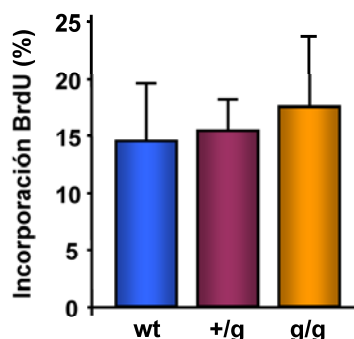


Figura 6: Efecto de la deficiencia de ING1b en proliferación celular: Tasa de incorporación de BrdU en MEFs de los genotipos indicados.

Genotipo	Nº Pase	
	Senescencia	Inmortalización
wt	5	15
wt	5	11
g/g	5	20
g/g	7	10

Tabla 4: Efecto de la deficiencia de ING1b en senescencia e inmortalización celular. Se indica el pase al cual las células entraron en senescencia o se immortalizaron en un ensayo de pases seriados 3T3. El ensayo se realizó con 2 preparaciones de MEFs diferentes por genotipo.

2.2.- Análisis de la respuesta a estrés genotóxico en ausencia de ING1b.

Para evitar la propagación de alteraciones genéticas originadas por agentes genotóxicos, las células son capaces de inducir tanto mecanismos de reparación del ADN como de apoptosis y de senescencia celular. En estos procesos se encuentra implicado el factor de transcripción p53. Se ha descrito que la proteína ING1b es necesaria en la respuesta a estrés genotóxico mediada por p53, por lo que nos propusimos analizar este tipo de respuesta celular en nuestro modelo de deficiencia en ING1b.

2.2.1.- Estudio de la respuesta a daño en el ADN en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en el locus *Ing1*.

En primer lugar analizamos el efecto de la falta de ING1b en fibroblastos embrionarios sometidos a tratamientos con diversos agentes que provocan daño en el ADN. Utilizamos adriamicina, un inhibidor de la topoisomerasa II que genera roturas en la doble cadena de ADN y que es capaz de activar p53 a través de la vía de la quinasa ATM; y radiación UV-C, que produce daño en el ADN como consecuencia de la formación de dímeros de pirimidinas, lo que activa p53 a través de la vía de ATR (Attardi et al., 2004). Como primer abordaje, sometimos a fibroblastos embrionarios de ambos genotipos a dosis crecientes de los diversos tratamientos y analizamos, por tinción con cristal violeta, el efecto en supervivencia celular. Observamos que la deficiencia en ING1b no altera significativamente la respuesta celular al daño inducido por adriamicina (Figura 7A) ni al inducido por UV-C en MEFs (Figura 7B). Estos datos fueron confirmados analizando la viabilidad celular por tinción con azul de tripano y

analizando la tasa metabólica de MEFs de ambos genotipos sometidos a los tratamientos anteriormente mencionados (datos no mostrados).

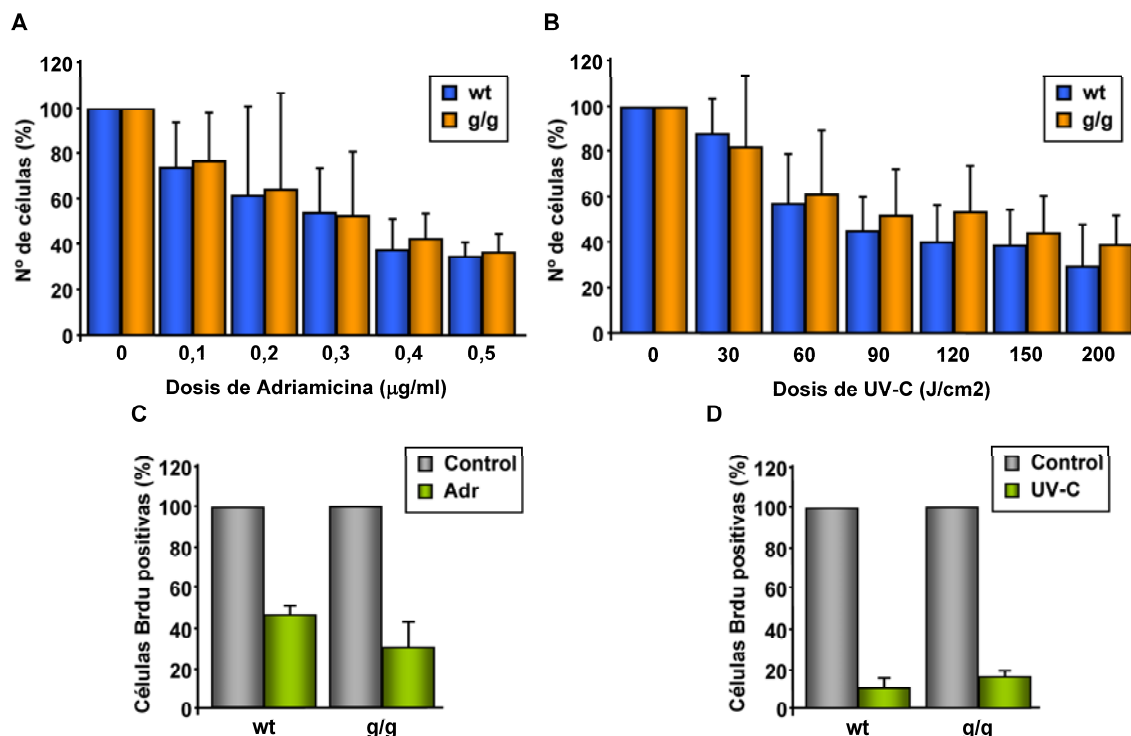


Figura 7: Efecto de la deficiencia de ING1b en respuesta celular a estrés genotóxico. (A y B) Ensayos de supervivencia de MEFs de los genotipos indicados tras 24 horas de tratamiento con diferentes dosis de adriamicina (A) y UV-C (B). La supervivencia se cuantificó por tinción con cristal violeta. (C y D) Tasa de incorporación de BrdU en MEFs de los genotipos indicados tras 24 horas de tratamiento con 0,2 µg/ml adriamicina (C) o 40 J/cm² UV-C (D).

Por otro lado, dado que en fibroblastos embrionarios de ratón la respuesta de p53 a daño genotóxico conlleva una parada del ciclo celular (Attardi et al., 2004), quisimos analizar la tasa de síntesis de ADN en MEFs de ambos genotipos sometidos a una única dosis de adriamicina o UV-C. Para ello tratamos las células con estos estímulos durante 24h y analizamos la tasa de síntesis de ADN detectando la incorporación de BrdU por inmunofluorescencia. Tal como esperábamos, el número de células positivas para BrdU disminuyó en los MEFs wt tras los dos tratamientos. Los MEFs deficientes para ING1b presentaron un comportamiento similar a los silvestres, disminuyendo su tasa de síntesis de ADN tanto en respuesta a adriamicina como en respuesta a UV-C (Figuras 7C y 7D).

Se sabe que la proteína p53 se induce en respuesta a estrés genotóxico; además, para que se active correctamente es necesario que sufra una serie de modificaciones postraduccionales entre las que se encuentran la fosforilación de residuos de serina y la posterior acetilación de residuos de lisina (Grossman, 2001). Se ha descrito que miembros de la familia ING (ING1, ING2, ING4, ING5) son capaces de promover la acetilación de p53 y por

tanto su activación, por lo que nos pareció interesante estudiar la activación de la proteína p53 en respuesta a estrés genotóxico en los fibroblastos deficientes en ING1b.

Para analizar si p53 se induce correctamente en ausencia de ING1b, sometimos a MEFs wt y g/g a una única dosis de adriamicina o UV-C durante un periodo de 4h y posteriormente analizamos por *Western-blot* la expresión de la proteína p53. Tal como está descrito, observamos una inducción en los niveles de expresión de p53 en los fibroblastos silvestres tras cualquiera de los dos tratamientos; en los MEFs deficientes en ING1b apreciamos una inducción de p53 similar a la de los MEFs wt (Figura 8A).

Para estudiar el grado de fosforilación y de acetilación de p53 en repuesta a estrés genotóxico, tratamos MEFs de ambos genotipos con adriamicina, de manera similar al ensayo anterior. Posteriormente realizamos ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a p53 y detectamos en los inmunoprecipitados tanto la forma fosforilada como la forma acetilada de la proteína. Observamos que en los fibroblastos silvestres p53 se fosforila y acetila tras el tratamiento con adriamicina; la deficiencia en ING1b no conlleva un defecto apreciable en la activación de p53 ya que detectamos niveles similares de proteína fosforilada y acetilada a los observados en los fibroblastos wt (Figura 8B).

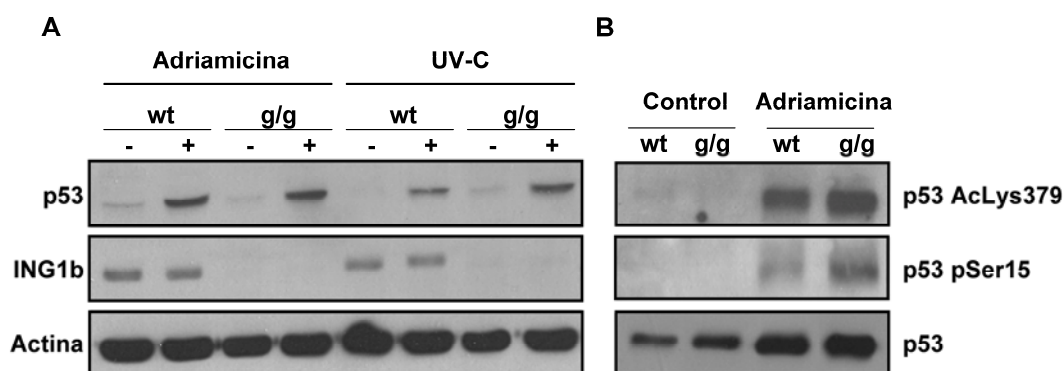


Figura 8: Efecto de la deficiencia de ING1b en la activación de p53 en respuesta a estrés genotóxico. (A) Análisis por *Western-blot* de la inducción de p53 en MEFs de los genotipos indicados tras 4 horas de tratamiento con 0,2 $\mu\text{g/ml}$ adriamicina o 40 J/cm^2 UV-C. (B) Ensayos de inmunoprecipitación de p53. MEFs de los genotipos indicados se sometieron a 4 horas de tratamiento con adriamicina (0,2 $\mu\text{g/ml}$), con los extractos proteicos de estas células se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo específico frente a p53. En los inmunoprecipitados se detectó la presencia de la forma acetilada y fosforilada de la proteína utilizando anticuerpos específicos para ellas.

2.2.2.-Análisis de la respuesta a estrés genotóxico mediada por p53 en animales deficientes en *Ing1*.

Se sabe que la respuesta mediada por p53 a estrés genotóxico varía dependiendo del tipo celular u órgano analizado y del estímulo que cause el daño en el ADN (Fei et al., 2002; Murray-Zmijewski et al., 2008). Por tanto, aunque no apreciamos efectos significativos de la deficiencia de ING1b en esta respuesta en fibroblastos embrionarios de ratón, decidimos ampliar el estudio a un modelo más fisiológico analizando esta respuesta en diversos órganos

de ratones silvestres o deficientes en el locus *Ing1*. Para provocar estrés genotóxico sometimos a los animales a una única dosis de 5 Gray (Gy) de radiación gamma, un estímulo que provoca activación de p53 en diversos órganos (Fei et al., 2002). Seis horas después de la irradiación los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de diferentes órganos para analizar por *Western-blot* la expresión de varias proteínas.

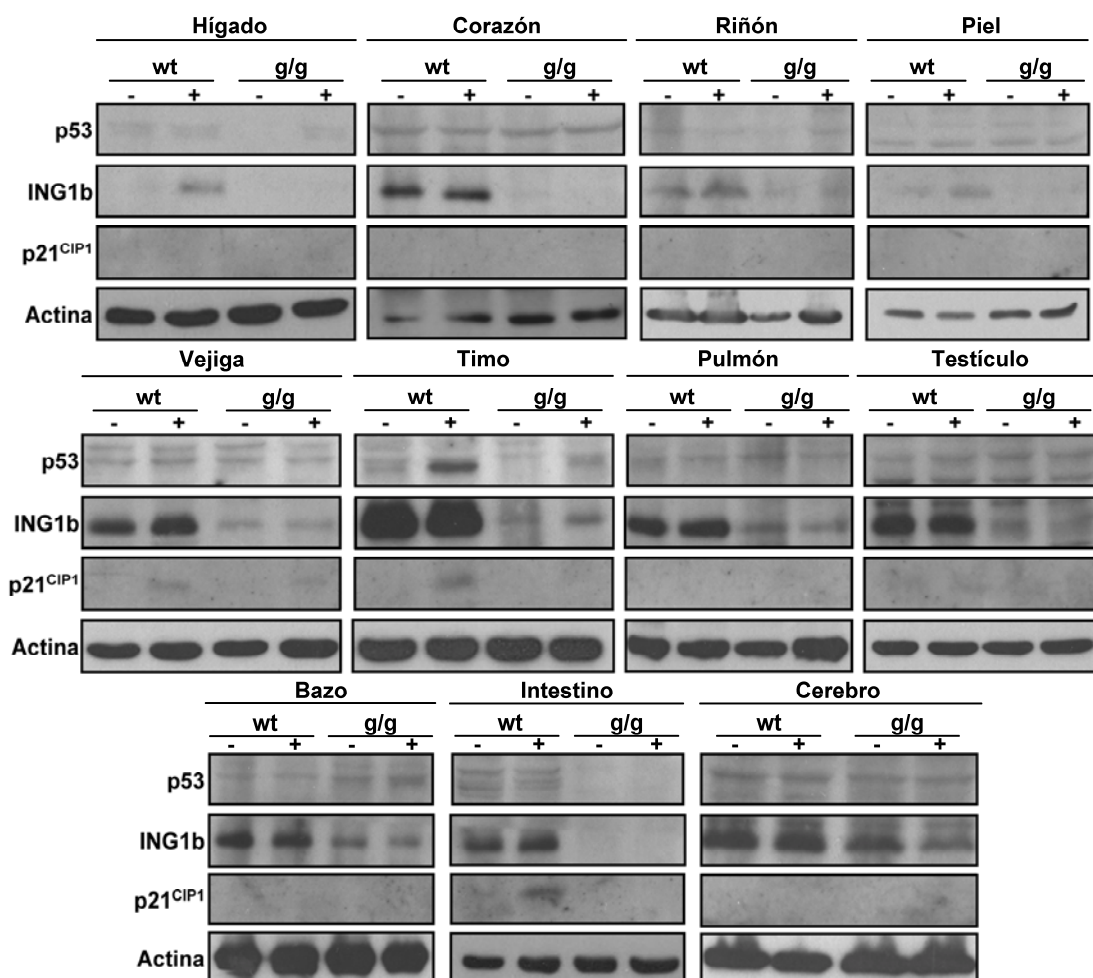


Figura 9: Estudio de la inducción de p53 *in vivo* en respuesta a estrés genotóxico: Ratones de los genotipos indicados se sometieron a una única dosis de radiación γ (5 Gy), 6 horas después los animales fueron sacrificados. Análisis por *Western blot* de la expresión de p53, p21^{CIP1} e ING1b en órganos de animales de los genotipos indicados irradiados (+) o control sin irradiar(-).

Entre todos los órganos analizados únicamente observamos un claro aumento de los niveles de la proteína p53 tras el tratamiento con radiación gamma en el timo de animales silvestres, y en menor medida en vejiga (Figura 9). Analizamos también los niveles de la proteína p21^{CIP1}, diana transcripcional de p53, y observamos incrementada su expresión en aquellos órganos en los que detectamos acumulación de p53, vejiga y timo, así como en intestino, órgano en el que está bien caracterizada la implicación de p53 en respuesta a radiación gamma (Fei et al., 2002). En los animales deficientes en *Ing1* sólo apreciamos inducción de p53 en el timo, y ésta fue menor a la observada en los ratones silvestres.

Además, en ninguno de los órganos analizados detectamos expresión de p21^{CIP1} tras el tratamiento con radiación gamma (Figura 9). Estos datos sugieren que el locus *Ing1* puede tener un papel importante en la respuesta a estrés genotóxico mediada por p53 *in vivo*.

Como se muestra en la figura 9, durante estos ensayos observamos también que la proteína ING1b aumenta sus niveles en respuesta a radiación gamma aunque no de manera general, así vemos inducción en riñón, vejiga y piel, mientras que en el resto de órganos analizados los niveles de proteína ING1b no varían.

Varios estudios *in vitro* sugieren la implicación de ING1b en la regulación transcripcional de genes diana de p53, como p21^{CIP1}, Mdm2 o Bax en distintos tipos celulares (Garkavtsev et al., 1998; Cheung y Li, 2002; Zhu et al., 2006; González et al., 2006). Por tanto, a la vista de los datos obtenidos con p53, quisimos analizar si la deficiencia de *Ing1 in vivo* altera la expresión de genes relacionados con p53 e implicados en las respuestas mediadas por esta proteína. Elegimos analizar el timo, por ser el órgano donde el efecto diferencial de *Ing1* en p53 parecía mas evidente y por el alto nivel de expresión de ING1b en este órgano. Para ello extrajimos ARN total de timos de animales de ambos genotipos sometidos a irradiación en las condiciones descritas anteriormente o controles sin irradiar, y estudiamos el patrón de expresión de algunos de estos genes utilizando una matriz de expresión de PCR cuantitativa.

Como cabía esperar, en el timo de animales silvestres sometidos a irradiación observamos una inducción en la expresión de genes proapoptóticos relacionados con p53, como Zmat3, Tnf, Tnfrsf10b (KILLER), Bax, Pmaip1, Apaf1, FasL o Bnip3; así como de genes implicados en parada de ciclo celular, como p21^{CIP1}, ciclina G1, estratifina, sestrina y GADD45a, y reguladores de la transcripción como Jun, Wt1, Egr1 o Esr1. También detectamos inducción del regulador de p53, Mdm2. Por otra parte, la irradiación en el timo de estos animales reprime la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular como la ciclina E2, Cdk1, Cdk4, E2F1, PCNA o Chk1 (Burns y El-Deiry, 2003) (Figura 10). En el caso de los ratones *gene-trap*, el patrón general de expresión fue similar al de los animales silvestres, observamos también la inducción de genes relacionados con apoptosis como Zmat3, Tnfrsf10b, Bax o Pmaip1, y represión de genes implicados en progresión del ciclo celular como ciclina E2, Cdk4, Cdk1 o Cdc25c (Figura 10). Sin embargo, detectamos varias diferencias en el patrón de expresión entre timos de animales wt y timos de ratones g/g tras irradiación. En el timo de los animales *gene-trap* observamos una inducción reducida o no inducción de varios genes proapoptóticos como Tnf, FasL y Apaf1, así como de los reguladores transcripcionales Jun y Esr1, y de los genes implicados en la parada de ciclo celular ciclina G1, Gadd45 o p21^{CIP1}. El regulador, y gen diana de p53, Mdm2, también

presenta menor nivel de inducción en los timos deficientes en *Ing1* tras irradiación. Por otra parte, también identificamos una serie de genes cuyos niveles no se ven alterados en timos de animales wt en respuesta a irradiación pero sí en los timos de animales deficientes en *Ing1*. Detectamos la inducción de genes como Cul9, proteína implicada en regular la localización subcelular de p53 y que forma parte de complejos con actividad ubiquitin-ligasa, Reprimo, represor de ciclo celular, y de otros genes con funciones diversas (Myod, Kras, Atr, Nf1, Prkca, Trp73, Dapk1). Observamos también represión en timos deficientes en *Ing1* de otro grupo de genes como Trp63, Pttg1 o Myc (Figura 10). En la tabla 5 se resumen los datos obtenidos del análisis de expresión de estos genes.

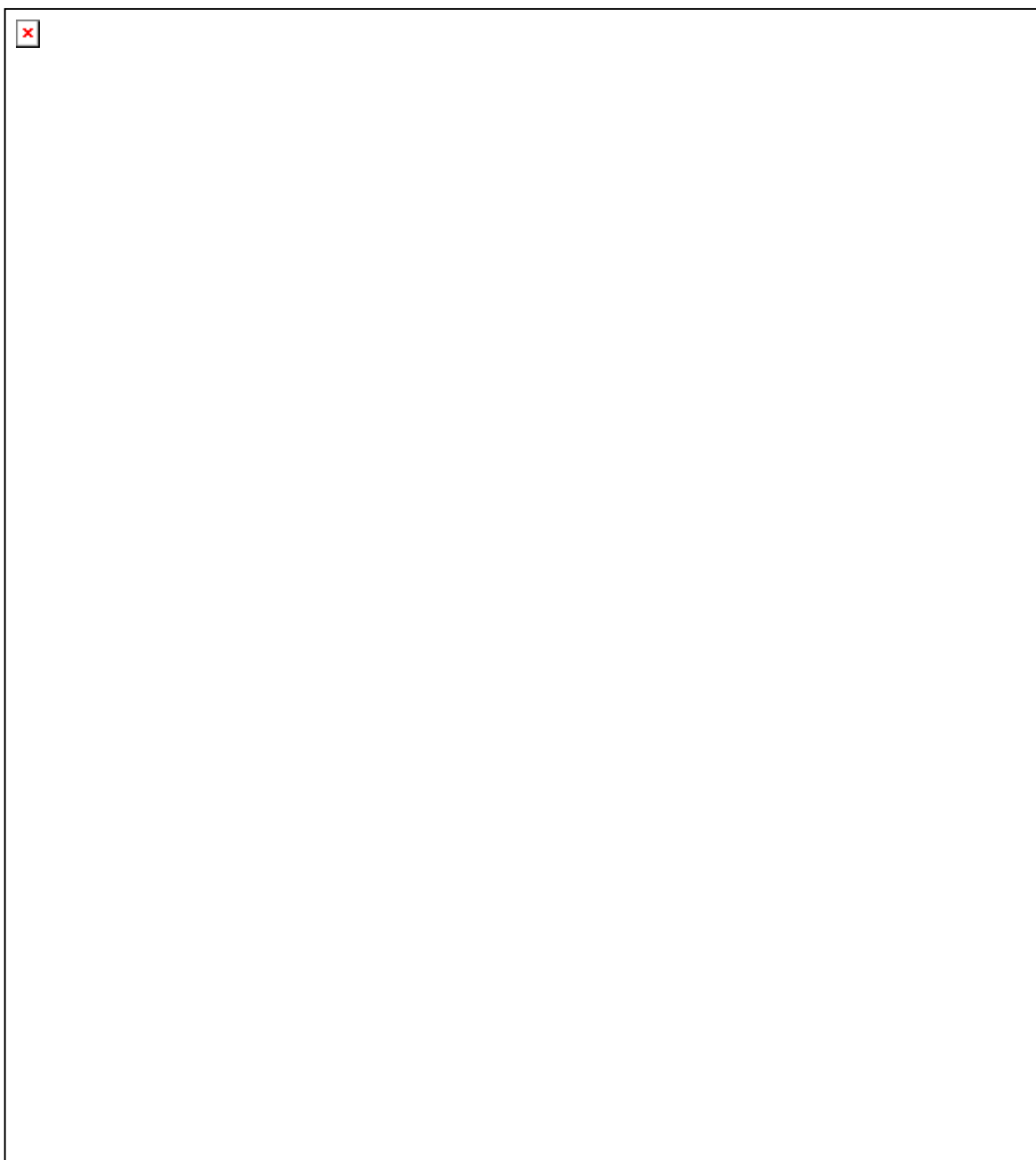


Figura 10: Análisis de la expresión de genes relacionados con p53 en timo en respuesta a radiación gamma. Se representa la expresión relativa de los diferentes genes en timos irradiados frente a timos control de los genotipos indicados.

Gen	Expresión relativa wt	Expresión relativa g/g	Expresión relativa g/g-wt	Funciones
Il6	91,6	94,4	1,1	Citoquina
Cdkn1a	11,4	8,2	0,7	Parada ciclo
Vcan	7,9	8,2	1,1	Señalización
Zmat3	7,7	8,6	1,1	Proapoptosis
Jun	7,4	4,4	0,6	Reg. transcripción
Tnf	6,3	3,9	0,6	Proapoptosis
Ccng1	5,6	3,6	0,6	Parada ciclo
Wt1	5,5	0,8	0,1	Reg. transcripción
Sfn	5,2	4,8	0,9	Parada ciclo
Tnfrsf10b	4,3	3,2	0,7	Proapoptosis
Serpinb5	4,1	3,4	0,8	Supresor tumoral
Bax	3,8	3,4	0,9	Proapoptosis
Sesn2	3,8	3,9	1,1	Parada ciclo
Pmaip1	3,6	2,9	0,8	Proapoptosis
Gadd45a	3,2	2,1	0,6	Parada ciclo
Egr1	3,2	2,6	0,8	Reg. transcripción
Apaf1	3,1	1,7	0,6	Proapoptosis
Fasl	2,8	1,3	0,4	Proapoptosis
Bnip3	2,5	1,9	0,8	Proapoptosis
Esr1	2,2	1,1	0,5	Reg. transcripción
Mdm2	2,1	1,3	0,6	Reg. p53
Dapk1	1,9	7,1	3,6	Proapoptosis
Trp73	1,5	5,6	3,6	Reg. transcripción
Prkca	1,4	5,4	3,7	Quinasa
Cul9	1,4	4,7	3,4	Reg. p53
Nf1	1,3	4,1	3,1	Reg. Ras
Trp63	1,2	0,4	0,3	Reg. transcripción
Pttg1	1,2	0,5	0,5	Reg p53
Atr	1,2	2,8	2,4	Quinasa
Myc	1,1	0,5	0,4	Reg. transcripción
Fadd	1,1	0,8	0,7	Proapoptosis
Kras	1,1	2,4	2,1	GTPasa
Trp53	1	0,6	0,6	Reg. transcripción
Rprm	0,7	55,7	73,6	Parada ciclo
Myod1	0,7	8,9	12,2	Reg. transcripción
Cdc25c	0,6	0,3	0,5	Progresión ciclo
Prc1	0,6	0,5	0,8	Citoquinas
Xrcc5	0,6	0,9	1,4	Reparación
Apex1	0,6	0,7	1,3	Reparación
Brca2	0,6	0,5	0,9	Reparación
Brca1	0,6	0,4	0,7	Supresor tumoral
Cdc25a	0,5	0,6	1,1	Progresión ciclo
Cdk4	0,4	0,3	0,8	Progresión ciclo
Cdc2a	0,4	0,3	0,8	Progresión ciclo
Bid	0,3	0,3	0,9	Apoptosis
E2f1	0,3	0,5	1,7	Progresión ciclo
Pcna	0,3	0,2	0,8	Progresión ciclo
Chek1	0,2	0,2	0,9	Parada ciclo
Ccne2	0,2	0,3	1,4	Progresión ciclo

Tabla 5: Se representan los valores de expresión de los genes indicados tanto en timos irradiados frente a sus controles sin irradiar de los genotipos indicados (calculado por la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct (I-C)}$), como los valores de expresión de los timos g/g respecto a los wt tras irradiación ($2^{-\Delta\Delta Ct (g/gI-g/gC)}/2^{-\Delta\Delta Ct (wtI-wtC)}$). Se muestra en rojo los genes con una reducción en su expresión mayor o igual a 0,5 veces, en naranja los genes con una reducción en su expresión mayor o igual a 0,7 veces, en verde oscuro los genes con una inducción en su expresión mayor o igual a 2 veces y en verde claro los genes con una inducción en su expresión mayor o igual a 1,5 veces; en amarillo se indican los genes que son dianas transcripcionales de p53. "Reg"= Regulación

Este ensayo nos ha permitido analizar también la expresión basal de estos genes relacionados con p53 en timos de animales de ambos genotipos en ausencia de estímulos de estrés. Sorprendentemente, observamos que los timos de animales *gene-trap* presentan altos niveles basales de los genes Fadd y Bnip3, relacionados con muerte celular; detectamos también altos niveles de Vcan, proteína relacionada con señalización intracelular, del factor de transcripción Wt1 y del regulador de p53 Cul9 (Figura 11). Por otra parte, hemos podido observar que en el timo de animales *gene-trap* se encuentra reducida la expresión de Myod1,

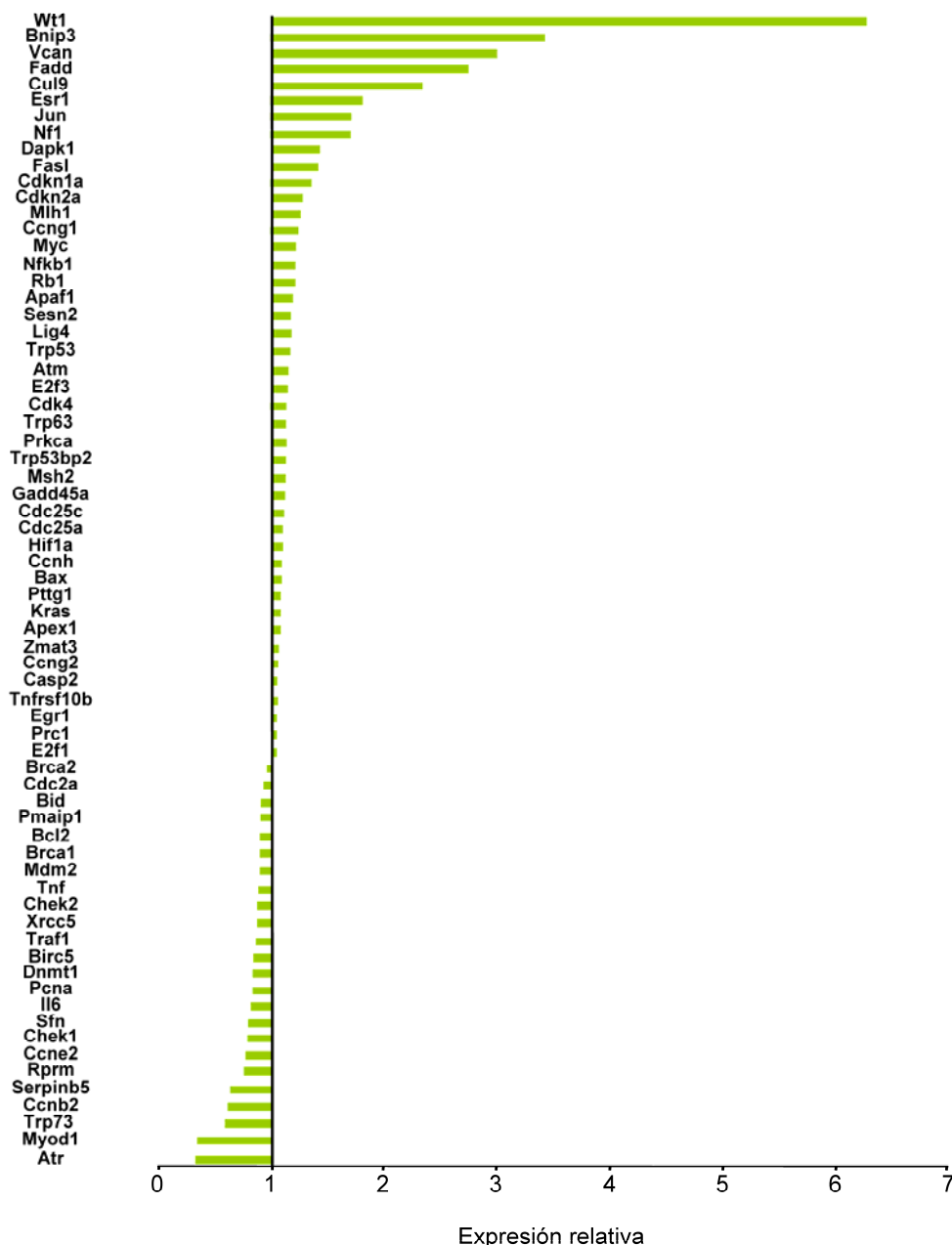


Figura 11: Análisis de la expresión basal de genes relacionados con p53 en timo. Se representan los niveles de expresión de los diferentes genes en timos g/g respecto a timos wt sin irradiar.

proteína relacionada con diferenciación celular, y de *Atr*, proteína implicada en el reconocimiento de estímulos genotóxicos; curiosamente, estos dos genes alcanzan unos niveles de expresión superiores en el timo de animales *gene-trap* tras irradiación que en el timo de animales wt (Figura 11). Hay que destacar que los resultados descritos corresponden a los datos obtenidos con las matrices de PCR cuantitativa y está pendiente la validación individual de cada uno de los genes con expresión diferencial.

3.- Papel de *Ing1* en supresión tumoral.

3.1.- Caracterización de animales deficientes en *Ing1*.

Como paso previo al estudio de la implicación de *Ing1* en supresión tumoral, quisimos analizar el efecto de la deficiencia de este locus en varios parámetros biológicos de los animales. En primer lugar estudiamos la tasa de nacimiento de los ratones deficientes en *Ing1* analizando el genotipo de las crías nacidas de cruces entre animales heterocigotos para el casete *gene-trap*. Observamos que los animales deficientes en *Ing1* nacen con una frecuencia similar a la de los animales silvestres (Figura 12) que coincide también con la frecuencia de nacimiento esperada (tabla 6), lo que indica que la falta de *Ing1* no conlleva letalidad embrionaria.

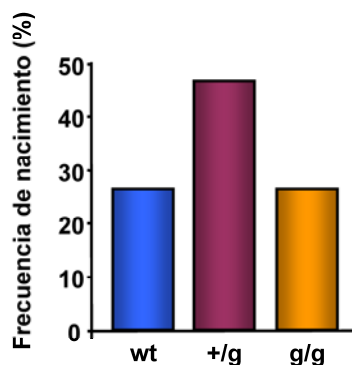


Figura 12: Frecuencia de nacimiento de animales silvestres, heterocigotos y homocigotos para el casete *gene-trap* establecida a partir de las camadas obtenidas de cruces entre animales heterocigotos para el casete *gene-trap*.

Nº Total crías: 30		
Genotipo	Nº Obtenido	Nº Esperado
wt	8	7
+/g	14	16
g/g	8	7

Tabla 6: Análisis del número de crías obtenido de cada genotipo Estudio del genotipo de 30 crías nacidas de 5 cruces entre animales heterocigotos para el casete *gene-trap*. Se representa el número de crías obtenido de cada genotipo frente al número de crías esperado.

Por otra parte, no apreciamos diferencias significativas entre los animales wt y los deficientes en *Ing1*, siendo indistinguibles a simple vista. El estudio de su peso y su tamaño corrobora que ambos genotipos tienen unas dimensiones similares (Figura 13A y 13B). Por último, aunque en otros modelos animales se ha descrito que hembras deficientes en *Ing1* muestran agresividad hacia sus crías (Kichina et al., 2006), en nuestro modelo no hemos

observado este comportamiento, siendo las hembras deficientes en *Ing1* tan buenas madres como las wt.

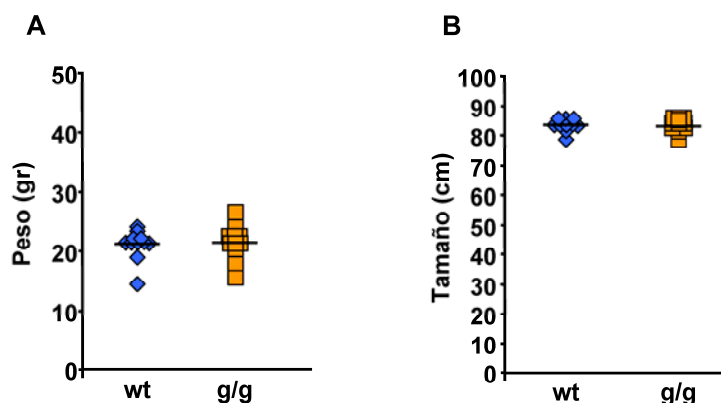


Figura 13: Caracterización de animales deficientes en *Ing1*. Peso (A) y tamaño (B) de animales de los genotipos indicados de entre 100 y 110 días de edad, cada punto representa un animal, la barra horizontal representa la media de los valores.

3.2.- Implicación de *Ing1* en respuesta a estrés oncogénico *in vivo*.

Durante nuestros estudios de la función de *Ing1* en respuestas antitumorales a nivel celular hemos observado que los fibroblastos embrionarios obtenidos de animales *gene-trap* presentan un defecto en la activación de la respuesta a estrés oncogénico (Abad et al., 2007). En fibroblastos embrionarios de ratón la expresión de Ras oncogénico conlleva la entrada en senescencia mediada principalmente por la vía de ARF-p53 (Serrano et al., 1997; Palmero et al., 1998). Analizando la tasa de síntesis de ADN de MEFs de ambos genotipos infectados con Ras V12 o con un vector vacío observamos que los fibroblastos deficientes en ING1b infectados con la forma oncogénica de Ras presentaron una tasa de proliferación similar, o incluso superior, a la de las células control (Figura 14A). Observamos también que, a diferencia de lo que ocurre en MEFs de genotipo silvestre, los MEFs g/g infectados con RasV12 mantienen una morfología normal y una menor inducción del marcador de senescencia SA- β -Gal (datos no mostrados) (Abad et al., 2007). Analizando los niveles de la proteína p53 observamos además que en los MEFs g/g la sobreexpresión de RasV12 no produce un aumento de p53 al mismo nivel que en los MEFs wt (Figura 14B). Estos datos sugieren que la proteína ING1b es necesaria para la respuesta antiproliferativa inducida por p53 en respuesta a estrés oncogénico (Abad et al., 2007).

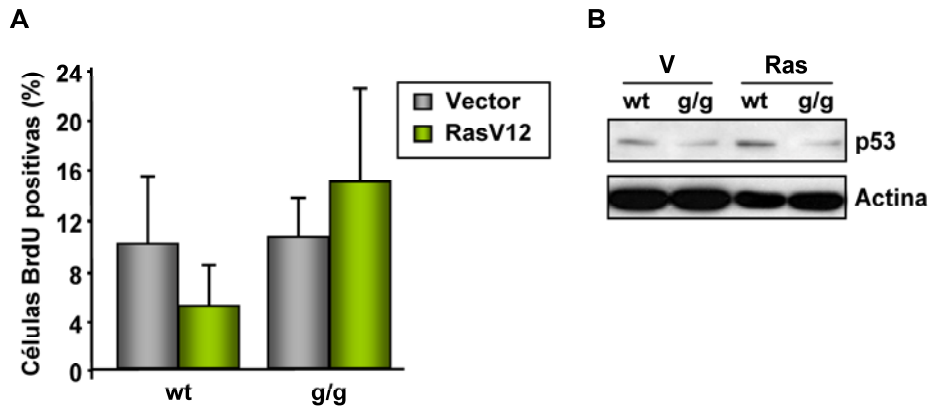


Figura 14: Efecto de la deficiencia de ING1b en respuesta celular a estrés oncogénico. (A) Tasa de incorporación de BrdU de MEFs de los genotipos indicados infectados con RasV12 o vector vacío, tras 6 días de selección. (B) Análisis por *Western-blot* de los niveles de expresión del supresor tumoral p53 en MEFs de los genotipos indicados infectados con el oncogén Ras V12 (Ras) o con vector vacío (V) a día 6 postselección.

La senescencia inducida por oncogenes tiene gran importancia a nivel fisiológico ya que supone una barrera en la progresión tumoral *in vivo*. Numerosos estudios han demostrado que la activación de oncogenes como K-Ras, B-Raf o la inactivación de supresores tumorales como PTEN son capaces de inducir senescencia *in vivo* (Braig et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Chen et al., 2005); además, se han detectado marcadores de senescencia como expresión de las proteínas p16INK4a y DcR2, así como tinción de SA- β -Gal y aparición de focos de heterocromatina, en lesiones benignas y no en tumores avanzados, lo que confirma el papel de la senescencia como barrera antitumoral (Courtois-Cox et al., 2008). Recientemente se ha demostrado que la reactivación de p53 en tumores conlleva una regresión del tumor por activación del proceso de senescencia (Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007). Dado que los estudios realizados *in vitro* en fibroblastos deficientes en ING1b indican un defecto en la inducción de senescencia por oncogenes, y por el papel descrito de *Ing1* como supresor tumoral, decidimos analizar esta respuesta *in vivo* sometiendo a los ratones deficientes en el locus *Ing1* a diferentes ensayos de carcinogénesis.

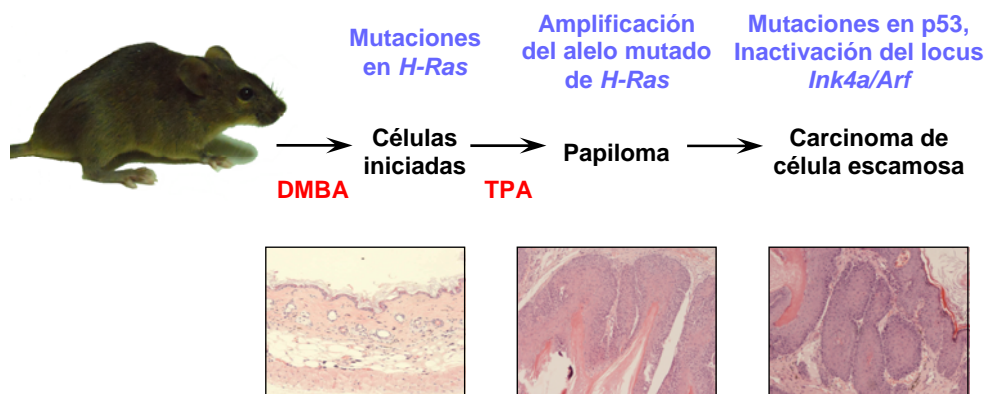


Figura 15: Representación esquemática del protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón.

3.2.1.- Modelo de carcinogénesis química en piel de ratón (DMBA/TPA).

Como primer modelo de tumorigénesis *in vivo* elegimos el protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón, porque nos permite analizar fácilmente los diferentes estadios en la aparición de un tumor y porque se ha descrito que la senescencia inducida por oncogenes es una importante barrera de supresión tumoral en este modelo (Collado et al., 2005; Sun et al., 2007). El protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón consiste en la administración tópica, en el lomo del animal, de una única dosis del carcinógeno DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno) seguida de un tratamiento de varias semanas con el promotor TPA (forbol 12-miristato 13-acetato) (Kemp, 2005). Como se representa en la figura 15, este protocolo puede dividirse en tres etapas: la primera etapa, o iniciación, se produce tras la administración del carcinógeno DMBA, éste provoca una mutación específica en el codón 61 del oncogén H-Ras (Gln61Leu), lo que supone un cambio genético irreversible (Balmain y Pragnell, 1983; Quintanilla et al., 1986). La segunda etapa, o promoción, se debe a la aplicación del éster de forbol TPA, este estímulo hiperproliferativo induce la expansión clonal de las células iniciadas provocando la aparición de lesiones premalignas conocidas como papilomas en las que aparecen marcadores de senescencia. En la última etapa, o progresión, muchas de las lesiones premalignas revierten y desaparecen al dejar de administrar el tratamiento con TPA; sin embargo, otras adquieren una serie de mutaciones adicionales que favorecen la transición de la lesión premaligna a un fenotipo maligno o carcinoma. Entre estas mutaciones cabe destacar las alteraciones cromosómicas que conllevan la amplificación del alelo mutante de Ras, así como la pérdida funcional de los supresores tumorales *Ink4a/Arf* y p53 (Bremner y Balmain, 1990; Ruggeri et al., 1991; Kemp, 2005).

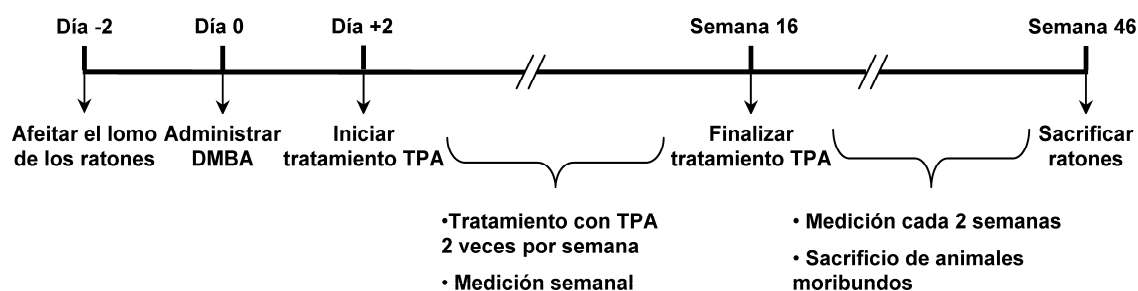


Figura 16: Diseño experimental del protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón. El ensayo se realizó con grupos de 10 animales de cada genotipo. Durante el tratamiento con TPA los animales fueron afeitados periódicamente para asegurar la correcta administración del TPA. Los animales moribundos o con lesiones superiores a 2 cm fueron sacrificados antes de concluir el ensayo.

Efecto de la deficiencia de *Ing1* en aparición y progresión de papilomas.

Para analizar el papel del locus *Ing1* en este modelo de carcinogénesis química *in vivo*, ratones de los diferentes genotipos fueron tratados con una única dosis del carcinógeno DMBA y posteriormente con el promotor TPA, 2 veces por semana, durante 16 semanas. Realizamos dos ensayos independientes con 10 animales de cada genotipo por ensayo. Los animales se mantuvieron en estudio durante un periodo de 46 semanas durante el cual los ratones moribundos fueron sacrificados conservando las lesiones para su posterior análisis. Pasado este período de tiempo, los animales se sacrificaron y recogimos las lesiones de cada animal para su posterior estudio tanto histopatológico como a nivel molecular (Figura 16).

Para estudiar la aparición y el crecimiento de las lesiones premalignas, examinamos a los animales semanalmente durante el tiempo de que duró el tratamiento con TPA, realizando mediciones de las lesiones observadas. Como se muestra en la figura 17, los ratones deficientes en *Ing1* comenzaron a desarrollar papilomas a la vez que los ratones silvestres y los heterocigotos para el casete *gene-trap* (semana 10 de tratamiento con TPA); además, observamos que estas lesiones crecieron a un ritmo similar durante el tiempo que duró el tratamiento. Tampoco encontramos diferencias en cuanto al número total de lesiones aparecidas al finalizar el tratamiento (Tabla 7).

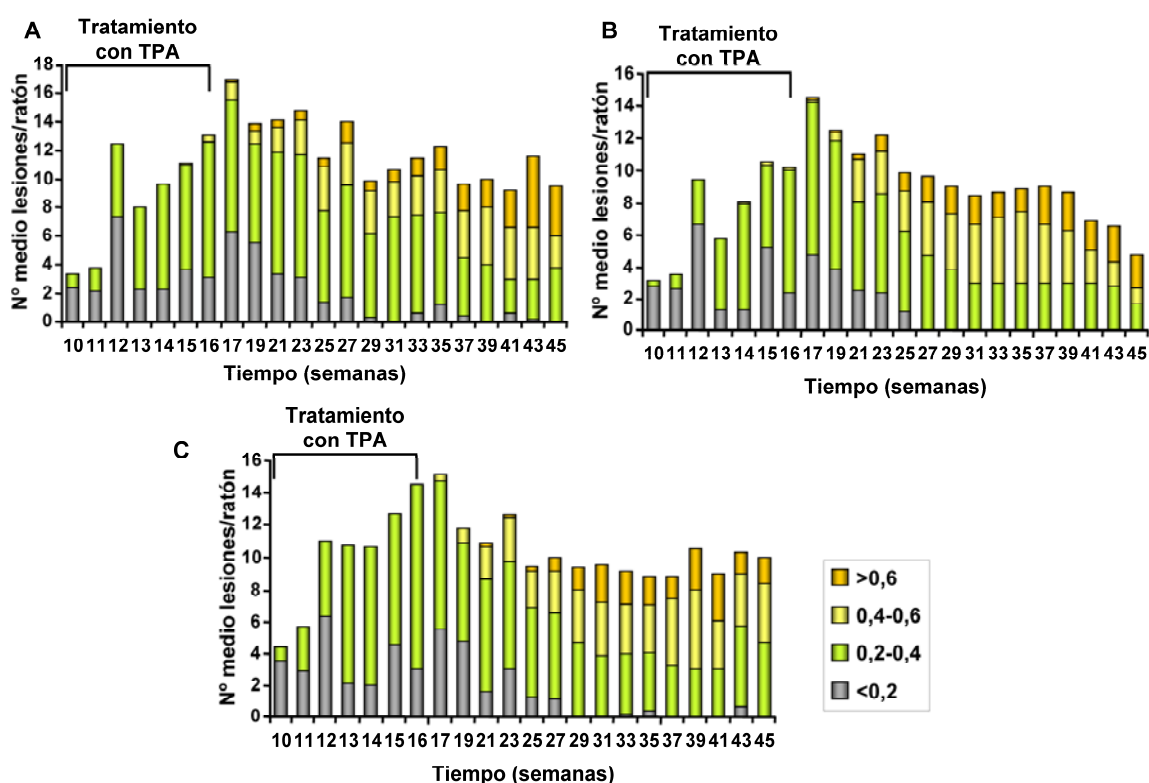


Figura 17: Aparición y crecimiento de papilomas. Análisis del número y tamaño de las lesiones aparecidas, en animales wt (A), heterocigotos (B) y homocigotos (C) para el casete *gene-trap*, durante el protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón. Se representa el número medio de lesiones por ratón para cada genotipo. Se muestra un ensayo representativo.

Una vez terminado el tratamiento con TPA analizamos la tasa de regresión de los papilomas, así como el crecimiento de las lesiones persistentes, realizando mediciones cada 2 semanas. Observamos que, tanto en los animales wt como en los deficientes en *Ing1*, las lesiones revirtieron de forma similar al dejar de administrar el éster de forbol (Tabla 7). Las lesiones que no regresaron crecieron a un ritmo ligeramente mayor en los animales wt que en los g/g; observamos que en los ratones silvestres aparecen antes lesiones mayores de 6 mm; y que, al concluir el ensayo, el porcentaje de lesiones mayores de 6 mm es superior en los animales wt (25,8% de las lesiones) que en los deficientes en *Ing1* (13,3% de las lesiones) (Figura 17).

Genotipo	Nº lesiones al finalizar el tratamiento	Nº lesiones al finalizar el ensayo	% Reversión
wt	13,3 ± 4,6	8,4 ± 3,8	38,1 ± 9,9
+/g	12,1 ± 4,1	6,8 ± 2,3	40,3 ± 19,1
g/g	14,5 ± 5,7	8 ± 4,5	47,5 ± 15,5

Tabla 7: Estudio de la aparición y reversión de las lesiones. Se indica el número de lesiones para cada genotipo al terminar el tratamiento con TPA y al finalizar el ensayo de carcinogénesis. El porcentaje de reversión se calcula en base al número medio de lesiones presentes en cada genotipo al finalizar el tratamiento con TPA y el número medio de lesiones observadas al finalizar el ensayo de carcinogénesis química.

Con el fin de estudiar el grado de malignidad de cada lesión realizamos un análisis histopatológicos de las muestras. Los datos de este análisis se recogen en la tabla 8. Como cabía esperar, la mayoría de las lesiones obtenidas tanto de los animales silvestres como de los heterocigotos u homocigotos para el casete *gene-trap* fueron papilomas cutáneos.

Se ha descrito que la tasa de conversión de papilomas a carcinomas suele ser de un 5-10%, aunque varía dependiendo de la cepa analizada (Kemp, 2005). En nuestro caso observamos que el porcentaje de papilomas que progresaron a lesiones malignas fue menor en los animales silvestres ($1,7 \pm 0,2\%$) que en los ratones deficientes en *Ing1* ($2,6 \pm 0,7\%$); curiosamente, los animales heterocigotos para el casete *gene-trap* presentaron una mayor tasa de conversión de papilomas a carcinomas ($4,3 \pm 1,4\%$) (Figura 18A). Todos los carcinomas obtenidos de estos ensayos, tanto de animales wt como g/g, presentaban el mismo grado de diferenciación, siendo en todos los casos carcinomas de células escamosas bien diferenciados (Figura 18B). En el análisis histopatológico detectamos además la presencia de queratoacantomas, lesiones benignas que aparecen frecuentemente en este modelo de tumorigénesis. Observamos que el porcentaje de estas lesiones fue similar en los animales de los diversos genotipos; así el 26,3% de las lesiones analizadas en los animales wt resultaron ser queratoacantomas, mientras que, tanto en animales homocigotos como heterocigotos para el casete *gene-trap*, el 34% de las lesiones analizadas fueron clasificadas como queratoacantomas (Tabla 8).

Genotipo	Ratón	Muestra	Informe
wt	13	Lesión 1	Papiloma cutáneo
		Lesión 2	Papilomas y queratoacantomas
	20	Lesión 3	Papiloma cutáneo (exofítico y endofítico)
		Lesión 5	Carcinoma de célula escamosa
	23	Lesión 1	Papiloma
		Lesión 3	Papiloma
		Lesión 4	Papiloma
		Lesión 6	Papiloma
	24	Lesión 1	Papiloma cutáneo
		Lesión 2	Carcinoma de célula escamosa
	36	Lesión 6	Papiloma
		Lesión 7	Papiloma interno
	38	Lesión 3	Papiloma cutáneo (exofítico y endofítico)
	41	Lesión 1	Papiloma cutáneo (exofítico y endofítico)
		Lesión 2	Queratoacantomas
		Lesión 3	Papiloma cutáneo (exofítico y endofítico)
	49	Lesión 1	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 2	Papiloma cutáneo
	52	Lesión 1	Papiloma y queratoacantoma
		Lesión 2	Queratoacantomas
		Lesión 7	Papiloma y queratoacantoma
	59	Lesión 1	Papiloma
		Lesión 2	Papiloma
		Lesión 4	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 6	Queratoacantomas
	70	Lesión 1	Papiloma cutáneo
		Lesión 3	Papiloma cutáneo endofítico
	71	Lesión 1	Papiloma y queratoacantoma
		Lesión 3	Papilomas múltiples
		Lesión 4	Papiloma
		Lesión 5	Queratoacantomas
		Lesión 7	Papiloma
		Lesión 9	Queratoacantomas
		Lesión 12	Papiloma
		Lesión 16	Papiloma
	72	Lesión 1	Papiloma y queratoacantoma
		Lesión 3	Papiloma
		Lesión 4	Papiloma
+/g	14	Lesión 3	Papiloma
		Lesión 4	Carcinoma de célula escamosa
	30	Lesión 2	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 3	Carcinoma de célula escamosa
	37	Lesión 1	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 5	Carcinoma de célula escamosa
	42	Lesión 1	Papiloma y queratoacantoma
		Lesión 2	Queratoacantomas
	44	Lesión 1	Papiloma
		Lesión 2	Papiloma cutáneo
		Lesión 5	Queratoacantoma
		Lesión 6	Queratoacantoma

+/g	51	Lesión 1	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 3	Papiloma
	53	Lesión 1	Queratoacantomas
		Lesión 2	Papiloma y queratoacantoma
		Lesión 3	Papiloma
		Lesión 4	Papiloma y queratoacantoma
		Lesión 6	Papiloma y queratoacantoma
	76	Lesión 1	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 3	Papiloma cutáneo
	81	Lesión 1	Papiloma
		Lesión 3	Papiloma
g/g	11	Lesión 1	Tejido necrosado
		Lesión 2	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 3	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 4	Queratoacantomas
	18	Lesión 1	Papiloma cutáneo
		Lesión 2	Queratoacantomas
		Lesión 3	Papiloma cutáneo
	19	Lesión 1	Papiloma cutáneo
	34	Lesión 1	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 2	Papiloma
		Lesión 3	Papiloma
	40	Lesión 3	Papiloma cutáneo
		Lesión 9	Papiloma cutáneo
		Lesión 11	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 12	Papiloma
	45	Lesión 1	Queratoacantomas
		Lesión 2	Hiperplasia epitelial con hiperqueratosis
	46	Lesión 1	Papilomas, queratoacantomas
	48	Lesión 1	Queratoacantomas
		Lesión 3	Papilomas, queratoacantomas
	56	Lesión 1	Queratoacantomas con micro abscesos
		Lesión 2	Queratoacantomas
		Lesión 3	Queratoacantomas
	57	Lesión 1	Carcinoma de célula escamosa
		Lesión 2	Papiloma
		Lesión 4	Queratoacantomas
		Lesión 7	Papiloma
	79		Carcinoma de célula escamosa

Tabla 8: Análisis histopatológico de las lesiones obtenidas del protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón

Como comentamos anteriormente, cada etapa del protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón viene acompañada de una serie de alteraciones moleculares características; así las células iniciadas con DMBA presentan una mutación específica en el codón 61 del oncogén H-Ras, mientras que durante la progresión a lesiones malignas se producen mutaciones en supresores tumorales como p53. Por tanto, nos pareció interesante estudiar, en las lesiones obtenidas en estos ensayos, la presencia de mutaciones tanto en el oncogén Ras como en p53. Para ello extrajimos ARN de las diferentes lesiones y analizamos

la presencia de mutaciones por ensayos de RT-PCR y secuenciación con oligonucleótidos específicos para cada gen. Como esperábamos, la mayoría de las muestras analizadas presentaron la mutación CAA-CTA en el codón 61 del oncogén H-Ras (Tabla 9).

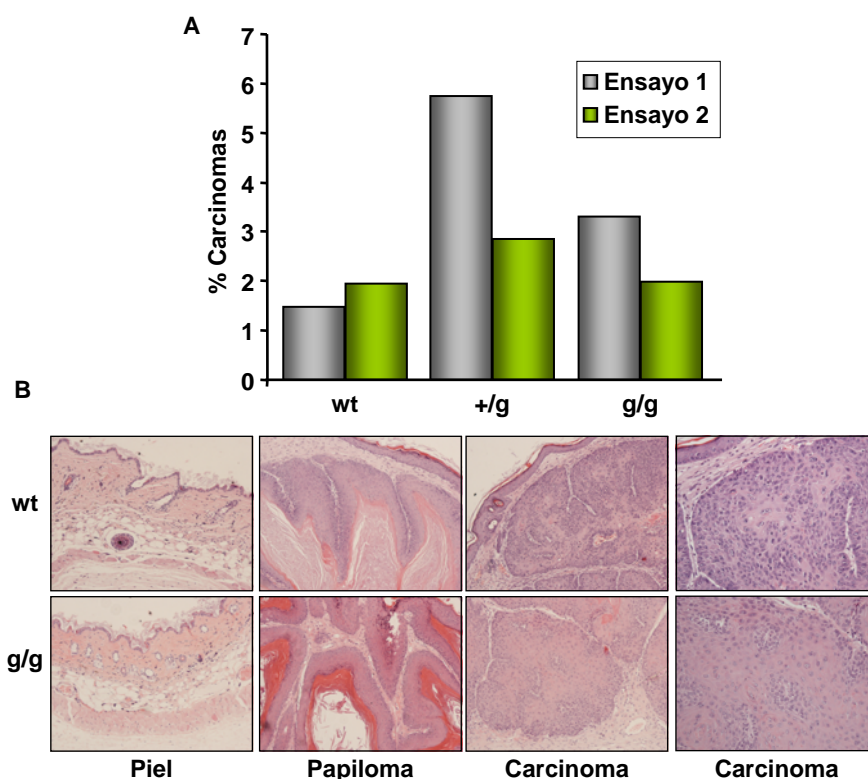


Figura 18: Estudio de la aparición de carcinomas. (A) Tasa de conversión de papilomas a carcinomas calculada como el número de carcinomas obtenidos respecto al número máximo de papilomas por cada genotipo. Se muestra el resultado de dos experimentos independientes. (B) Imágenes de microscopía de campo claro de muestras teñidas con hematoxilina/eosina de piel, papiloma y carcinoma (aumento 100x) de animales de los genotipos indicados. La última foto es una imagen a mayor aumento de la anterior (400x).

No encontramos mutaciones del supresor tumoral p53 en ninguno de los papilomas analizados, independientemente del genotipo del animal; en el caso de los carcinomas, observamos que tanto en los animales heterocigotos como en los deficientes para *Ing1* la mitad de los carcinomas analizados presentaba mutado p53; en los animales wt ninguno de los carcinomas analizados presentó mutaciones en p53, si bien el número de muestras fue muy pequeño para poder concluir que existe alguna diferencia en este aspecto entre los animales silvestres y los deficientes para *Ing1* (Tabla 9).

Genotipo	Ras		p53	
	Papiloma	Carcinoma	Papiloma	Carcinoma
wt	2/2	2/2	0/4	0/2
+/g	1/2	5/6	0/4	3/4
g/g	2/2	6/7	0/4	2/4

Tabla 9: Estudio de mutaciones en Ras y p53. Se indica el número de muestras mutadas de las muestras analizadas para cada gen.

Estudio del comportamiento de ING1b en el protocolo de carcinogénesis química en piel.

Varios ensayos demuestran que el supresor tumoral ING1b se encuentra relacionado con el proceso de senescencia celular; así se ha visto que la sobreexpresión de ING1b en fibroblastos humanos induce una parada de su proliferación con características de senescencia celular (Garkavtsev et al., 1996; Goeman et al., 2005), mientras que la pérdida de expresión de esta proteína, por interferencia del ARNm, aumenta la capacidad proliferativa de células primarias (Garkavtsev y Riabowol, 1997). Estudios de nuestro laboratorio en fibroblastos primarios humanos relacionan a ING1b con la senescencia inducida por oncogenes; se ha visto que ING1b es inducido tras la activación del oncogén Ras en este tipo celular y que su presencia es necesaria para la entrada en senescencia (Abad, manuscrito enviado). Por tanto, quisimos analizar el comportamiento de esta proteína en la aparición de los papilomas y su progresión a lesiones malignas. Para ello extrajimos ARN tanto de muestras de piel, como de papilomas y carcinomas, de ratones silvestres y deficientes en *Ing1*, y realizamos ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para los diferentes transcritos del locus. Como se muestra en la figura 19A, observamos que, mientras que la expresión de todos los transcritos del locus es prácticamente indetectable en la piel de animales wt, ésta se induce en las lesiones premalignas y no varía posteriormente en la conversión a lesiones malignas. Estos datos fueron corroborados por ensayos de RT-PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos para el transcrito 1b (Figura 19B). En las muestras obtenidas de animales deficientes en *Ing1* observamos un comportamiento similar para el transcrito 1b/2 que el descrito para las muestras wt, el resto de transcritos del locus fueron indetectables independientemente de la lesión analizada (Figura 19A).

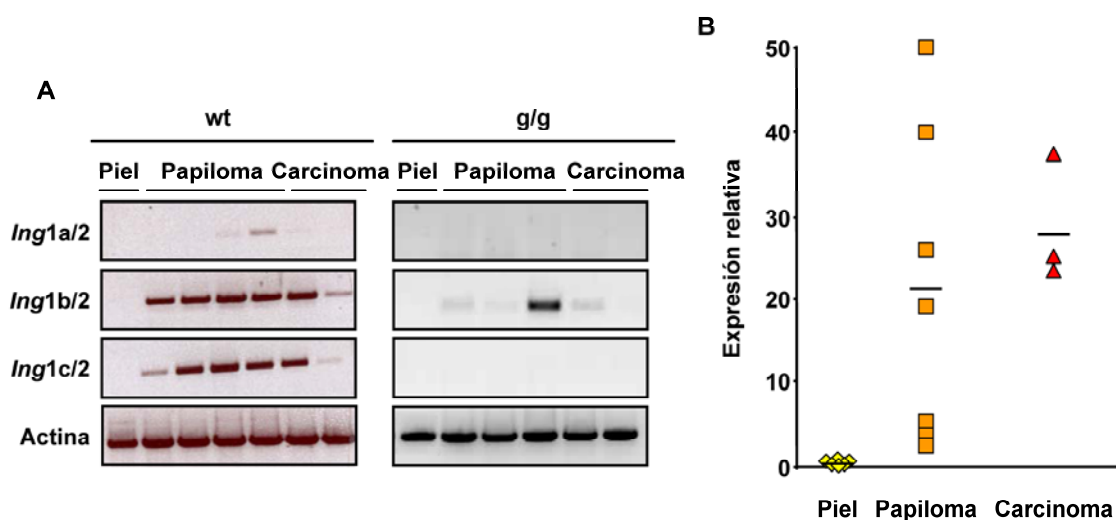


Figura 19: Expresión de los productos del locus *Ing1* en carcinogénesis química en piel de ratón. (A) Análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión de los transcritos alternativos del locus *Ing1* en muestras de piel, papiloma y carcinoma obtenidas tanto de animales silvestres como de animales deficientes en *Ing1*. (B) Estudio por PCR cuantitativa de la expresión del transcrito *Ing1b/2* en muestras de piel, papilomas y carcinomas obtenidas de animales silvestres.

Por otra parte, analizamos la expresión de la proteína ING1b en extractos proteicos generados a partir de muestras de piel, papiloma y carcinoma de animales wt y g/g. Como se observa en la figura 20A, y consistente con los datos obtenidos de la RT-PCR, la expresión de la proteína ING1b aumenta en las lesiones premalignas de los animales wt, y no varía cuando estos progresan a carcinomas; en los ratones deficientes en *Ing1* no se detecta expresión de ING1b en ninguna lesión. Como abordaje alternativo para analizar la expresión de la proteína ING1b, realizamos tinciones inmunohistoquímicas en cortes de piel y papiloma obtenidos tanto de animales wt como de ratones deficientes en *Ing1*. Observamos una inducción de la expresión de ING1b en los papilomas de ratones wt, mientras que sus niveles no varían en las lesiones obtenidas de animales g/g (Figura 20B).

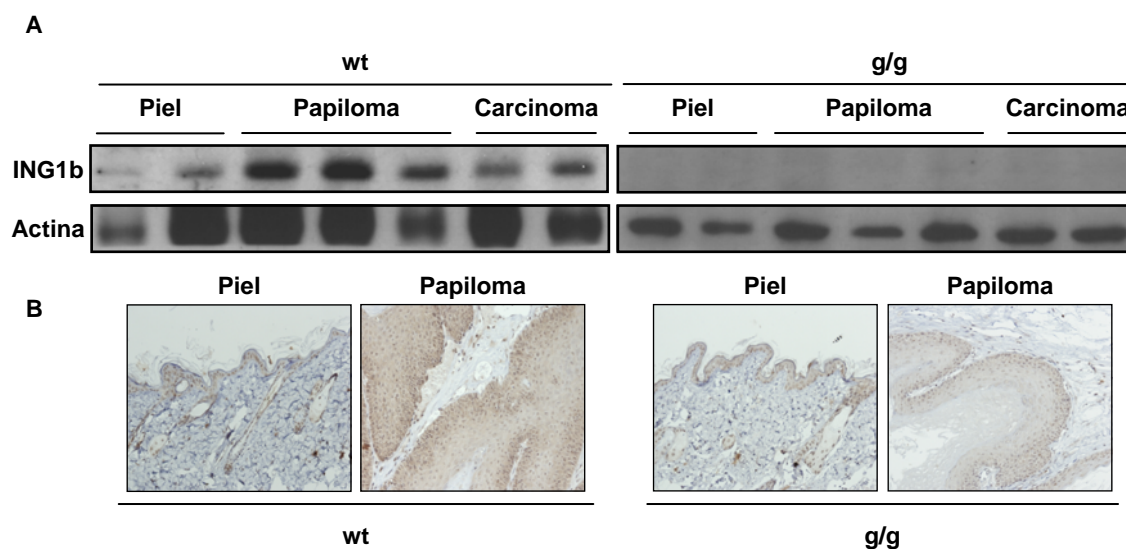


Figura 20: Expresión de ING1b en carcinogénesis química en piel de ratón. (A) Análisis por *Western-blot* de la expresión de la proteína ING1b en extractos de piel, papiloma y carcinoma obtenidos tanto de animales silvestres como de animales deficientes en *Ing1*. (B) Tinción inmunohistoquímica para ING1b en cortes de piel y papiloma obtenidos de animales de los genotipos indicados. Aumento 200x.

Implicación de ING1b en procesos inflamatorios.

La proteína ING1b se ha visto relacionada con procesos de inflamación: se sabe que ING1b reprime la vía de NF- κ B ya que es capaz de inducir la expresión de HSP70, proteína implicada en prevenir la degradación del inhibidor de NF- κ B, I κ B (Coles y Jones, 2009); por otro lado, datos de nuestro laboratorio sugieren una conexión entre ING1b y NF- κ B en regulación transcripcional (Gómez-Cabello, manuscrito enviado). El tratamiento con TPA produce una reacción inflamatoria, este proceso va acompañado de un engrosamiento de la epidermis y de la aparición de células leucocitarias (neutrófilos, eosinófilos y macrófagos) en la dermis (Reiners y Singh, 1997; Gebhardt et al., 2008). Ensayos preliminares de carcinogénesis química en piel de ratón mostraron que los animales deficientes en *Ing1* eran resistentes a la aparición de papilomas; el análisis posterior de los ratones utilizados en este ensayo reveló que tanto los animales wt como los g/g presentaban una infección que podría

estar activando una respuesta inflamatoria (datos no mostrados). Por tanto, nos pareció interesante analizar el papel de ING1b en la respuesta inflamatoria a TPA.

Para estudiar si los animales deficientes en *Ing1* presentan alterada la respuesta inflamatoria, administramos tópicamente a ratones wt y g/g una única dosis de TPA; 30 horas después del tratamiento los ratones fueron sacrificados y recogimos muestras tanto de la zona de piel tratada con TPA como de piel sin tratar. El análisis histopatológico de las muestras no reveló diferencias significativas entre ambos genotipos; todas las pieles tratadas con TPA presentaron hiperplasia epitelial, hiperqueratosis, dermatitis y edema (Figura 21A). Utilizando los cortes teñidos con hematoxilina y eosina del análisis histopatológico cuantificamos la presencia de células leucocitarias en la dermis de pieles tratadas con TPA. Como se muestra en la figura 21B, el número relativo de células leucocitarias en la dermis de pieles g/g tratadas con TPA ($661,2 \pm 72,5$) es ligera, aunque no significativamente menor que en las pieles wt (1024 ± 314). El estudio, en estos mismos cortes, del grosor de la epidermis refleja que tanto en las pieles wt como en las g/g se produce un engrosamiento similar de la epidermis tras el tratamiento con TPA (Figura 21C).

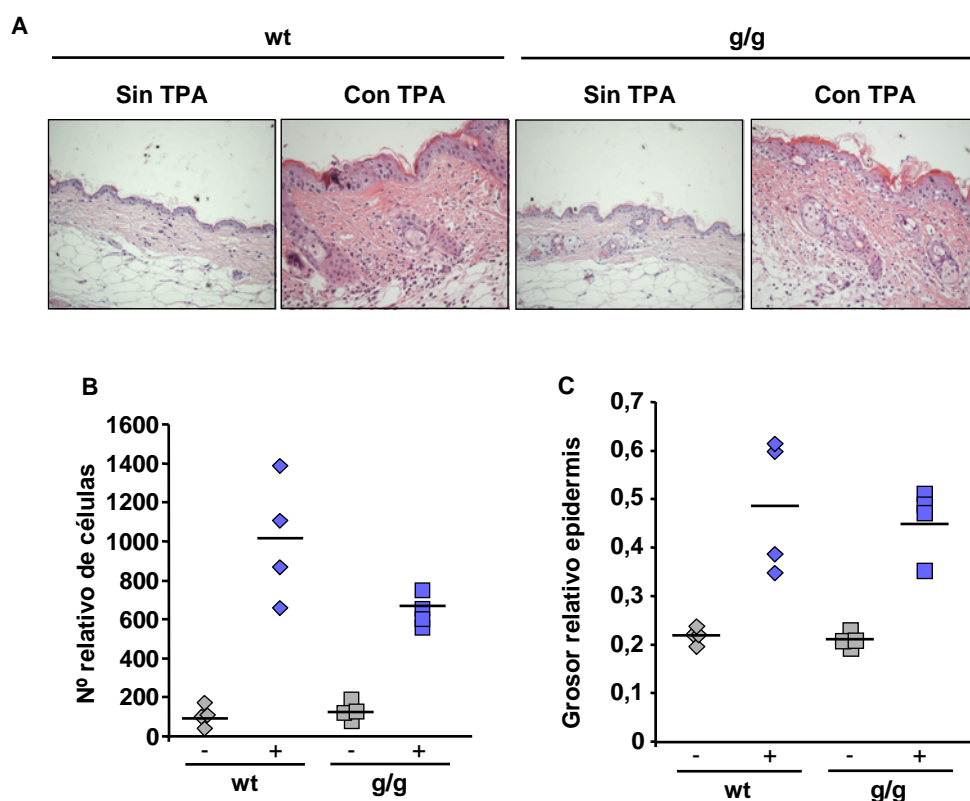


Figura 21: Estudio de la respuesta a TPA.: (A) Imágenes de microscopía de campo claro de muestras teñidas con hematoxilina/eosina de pieles tratadas y sin tratar con TPA de animales de los genotipos indicados (Aumento 200x) (B) Cuantificación de células inflamatorias presentes en la hipodermis de pieles de animales de los genotipos indicados tratadas (+) y sin tratar (-) con TPA (C) Estudio del engrosamiento de la epidermis de pieles de animales de los genotipos indicados tratadas (+) y sin tratar (-) con TPA.

Como alternativa para estudiar el grado de hiperproliferación de las células de la epidermis, realizamos tinciones inmunohistoquímicas frente al marcador de proliferación Ki67 en muestras de pieles de ambos genotipos, tratadas y sin tratar con TPA. Como esperábamos, el tratamiento con TPA induce la proliferación de las células de la epidermis (Figura 22A); además, corroborando los resultados anteriores, no apreciamos diferencias en el número de células Ki67 positivas entre muestras de pieles tratadas con TPA de los dos genotipos (Figura 22B).

Por último, para analizar si la expresión de la proteína ING1b varía en respuesta a procesos inflamatorios, obtuvimos extractos proteicos a partir de muestras de piel de animales wt, tanto tratadas como sin tratar con TPA, y analizamos por ensayos de *Western-blot* los niveles de expresión de ING1b. La cuantificación de estos ensayos muestra que ING1b no ve alterada su expresión en la respuesta inflamatoria a TPA (datos no mostrados).

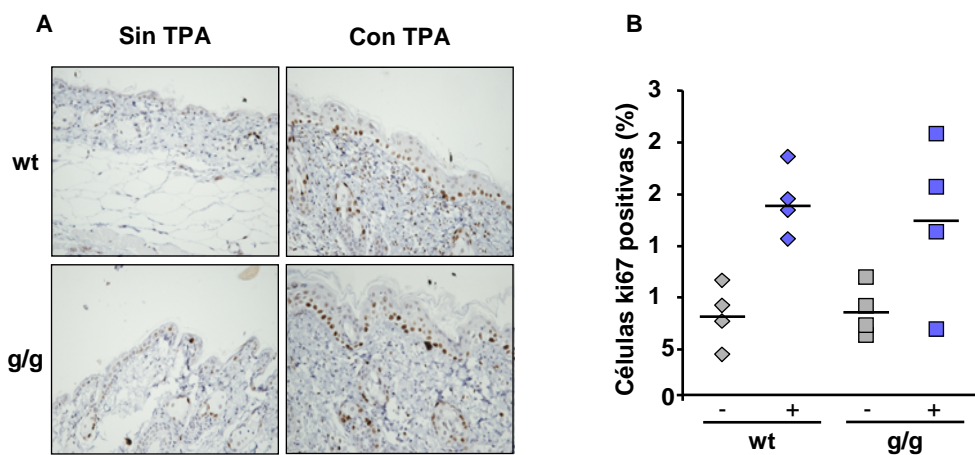


Figura 22: Efecto del TPA en la proliferación celular. (A) Tinción inmunohistoquímica para Ki67 en cortes de piel de animales de los genotipos indicados tratadas y sin tratar con TPA. Aumento 200x (B) Cuantificación de células Ki67 positivas.

3.2.2.- Modelo de inducción de fibrosarcomas (3-metilcolantreno).

Otro de los modelos de tumorigénesis más utilizado es la inducción de fibrosarcomas por 3-metilcolantreno. Este protocolo consiste en la inyección intramuscular de una única dosis del carcinógeno 3-metilcolantreno, un compuesto que provoca mutaciones en los oncogenes K-Ras y N-Ras dando lugar a la aparición de fibrosarcomas (Wexler y Rosenberg, 1979; Carbone et al., 1991).

Este modelo de tumorigénesis *in vivo* se ha relacionado también con el proceso de senescencia inducida por oncogenes, por lo que nos pareció interesante analizar la aparición de este tipo de tumores en los animales deficientes en *Ing1*. Para ello, administramos a ratones de los diferentes genotipos una única inyección intramuscular del carcinógeno 3-metilcolantreno. Analizamos la aparición de los tumores midiendo semanalmente el muslo de

los animales. Observamos que en los animales deficientes en *Ing1* la aparición de fibrosarcomas ocurre antes que en los animales wt; además, la incidencia de tumores en los ratones g/g es ligera, aunque no significativamente superior que en los ratones wt (Figura 23).

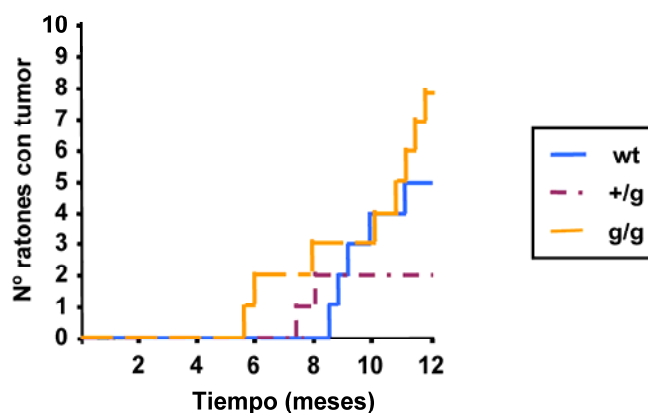
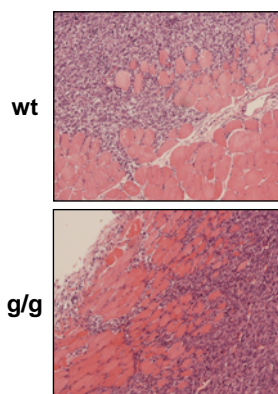


Figura 23: Efecto de la deficiencia de *Ing1* en la inducción de fibrosarcomas. Análisis de la aparición de fibrosarcomas en animales de los genotipos indicados tras la administración de 3-metilcolantreno intramuscularmente.

El análisis histopatológico de las muestras no reveló diferencias entre los tumores obtenidos de ratones de los diferentes genotipos (Figura 24) (Tabla 10).



Genotipo	Ratón	Informe
wt	107	Hemangiosarcoma
	146	Fibrosarcoma
	148	Fibrosarcoma
	181	Fibrosarcoma
+/g	130	Fibrosarcoma
	132	Fibrosarcoma
g/g	124	Fibrosarcoma
	129	Fibrosarcoma
	171	Fibrosarcoma
	172	Hemangiosarcoma
	173	Fibrosarcoma osificante
	155	Fibrosarcoma
	156	Fibrosarcoma
	176	Fibrosarcoma

Figura 24: Imágenes de microscopía de campo claro de cortes teñidos con hematoxilina/eosina de fibrosarcomas obtenidos de animales de los genotipos indicados. Aumento 400x.

Tabla 10: Análisis histopatológico de los tumores obtenidos en el protocolo de inducción de fibrosarcomas por 3-metilcolantreno.

Al igual que otros tumores, la formación de fibrosarcomas es altamente dependiente de p53 (García-Cao et al., 2002; Efeyan et al., 2006). Para estudiar el estatus de p53 en estos tumores, derivamos líneas celulares de fibrosarcomas obtenidos tanto de animales wt como de animales deficientes en *Ing1* y las sometimos a un tratamiento con adriamicina durante 4h,

posteriormente analizamos por ensayos de *Western-blot* los niveles de expresión de p53 en extractos proteicos extraídos de estas líneas celulares. Aunque el número de muestras analizadas fue pequeño, no apreciamos diferencias significativas entre ambos genotipos; así, en las líneas derivadas de fibrosarcomas wt observamos que p53 se encuentra mutado en la mayoría de las líneas celulares analizadas (2/3 de las líneas wt), ya que sus niveles de expresión son elevados incluso en ausencia de estrés genotóxico; la otra línea celular analizada presenta un comportamiento normal, con inducción tanto de p53 como de p21^{CIP1} en respuesta a daño genotóxico. En el caso de las líneas derivadas de fibrosarcomas g/g detectamos también altos niveles de p53 en la mayoría de las líneas estudiadas (3/4 de las líneas g/g); en este caso, en la otra línea celular analizada no detectamos inducción ni de p53 ni de su diana transcripcional p21^{CIP1}, por lo que no podemos descartar que también se encuentre mutada (Figura 25A).

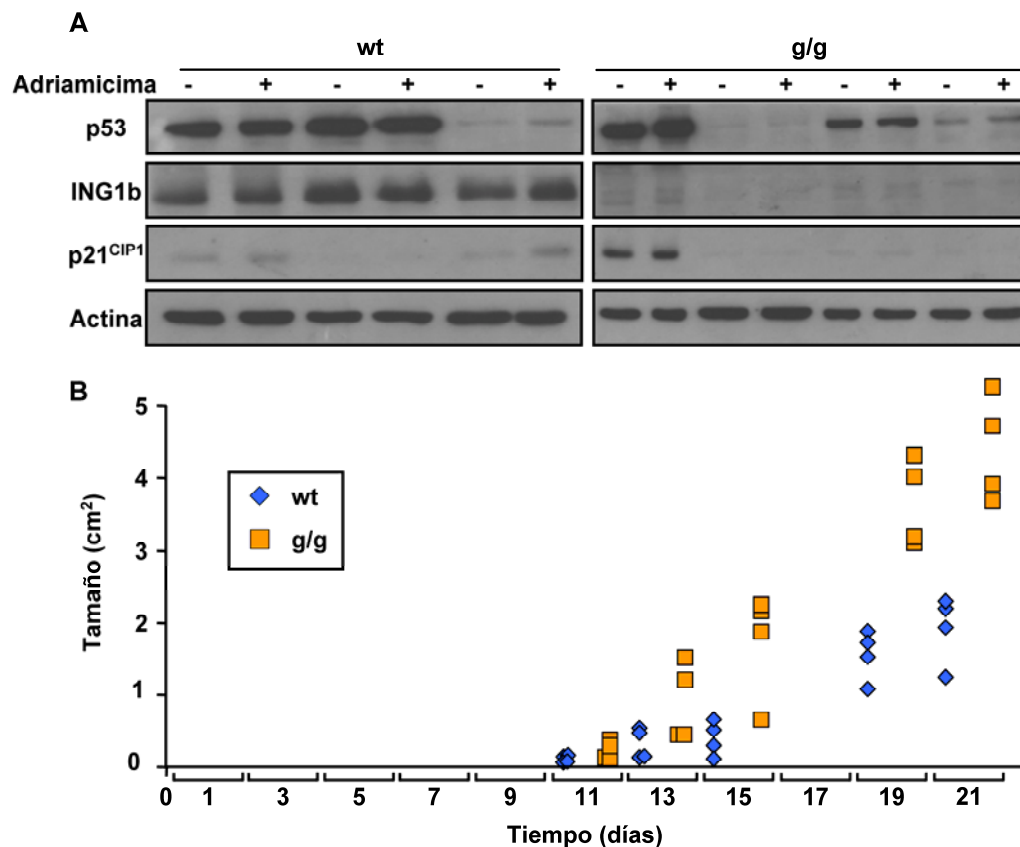


Figura 25: Estudio de líneas celulares derivadas de fibrosarcomas: (A) Análisis por *Western-blot* de la inducción de p53, p21^{CIP1} e ING1b en líneas celulares sometidas a un tratamiento de 4 horas con adriamicina (0,2 µg/ml). (B) Estudio de la formación y crecimiento de tumores en ratones desnudos.

Por otro lado, quisimos evaluar la capacidad tumorigénica de estas líneas celulares. Para ello las inyectamos subcutáneamente en ratones desnudos nu/nu y analizamos la aparición de tumores. Tanto las líneas celulares derivadas de fibrosarcomas wt como las derivadas de fibrosarcomas g/g son capaces de generar tumores en ratones desnudos; como

se muestra en la figura 25B, observamos que los tumores generados a partir de las líneas g/g crecen más rápidamente que los generados a partir de líneas wt, alcanzando mayores tamaños.

3.2.3.- Efecto de la deficiencia de *Ing1* en la aparición de melanoma.

Los melanomas son tumores malignos originados a partir de melanocitos. Entre las lesiones genéticas responsables de la aparición de estos tumores destacan la inactivación del locus *INK4a/ARF* y la activación de oncogenes como N-Ras. Se ha descrito que el proceso de senescencia inducida por oncogenes juega un papel importante en la aparición de estas lesiones malignas (Haferkamp et al., 2009; Yu et al., 2009); además, se han encontrado mutaciones del supresor tumoral ING1b en este tipo de tumores (ver Introducción). Por todo esto nos planteamos estudiar el efecto de la deficiencia de *Ing1* en la aparición de melanomas.

Los ratones son animales resistentes a la aparición de melanomas por lo que se han desarrollado diversos modelos de animales transgénicos en los que se trata de emular la enfermedad humana para poder estudiarla (Walker y Hayward, 2002; Larue y Beermann, 2007). Uno de estos modelos consiste en la expresión de la forma constitutivamente activa del oncogén N-Ras (N-Ras^{Q61K}) bajo el control del promotor de la tirosinasa, enzima responsable de la formación de melanina (Tyr::N-Ras^{Q61K}), de manera que la expresión del oncogén queda restringida a los melanocitos. Estos animales presentan una alta pigmentación en la piel, especialmente evidente en las orejas y las patas. Histológicamente, se observa la presencia de melanocitos y depósitos de melanina tanto en la dermis papilar como en el tejido graso subcutáneo. Estos ratones desarrollan melanomas espontáneamente alrededor del año de edad; la incidencia y latencia de aparición de estos tumores se ve drásticamente aumentada al expresar el transgen en animales carentes del locus *Ink4a/Arf* (Ackermann et al., 2005).

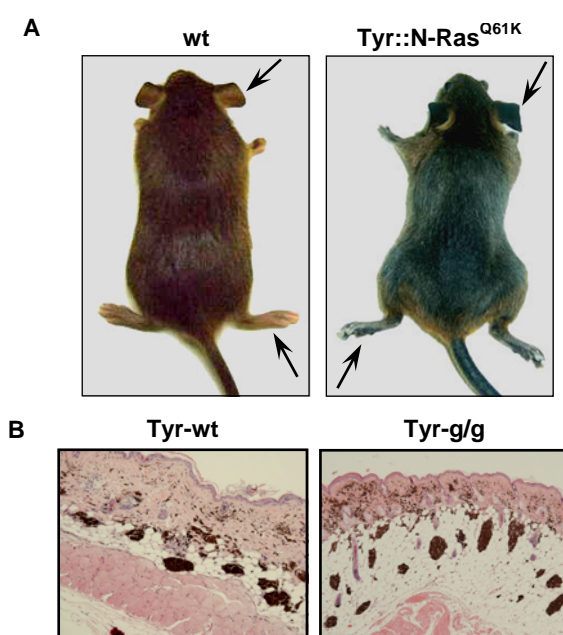


Figura 26: Animales transgénicos para Tyr::N-Ras^{Q61K}. (A) Comparación entre animales silvestres y transgénicos para Tyr::N-Ras^{Q61K}. (B) Imágenes de microscopía de campo claro de cortes de piel, teñidos con hematoxilina/eosina, de animales Tyr::N-Ras^{Q61K} y silvestres (Tyr-wt) u homocigotos (Tyr-g/g) para el casete *gene-trap*. Aumento 200x.

Con el fin de analizar el papel del locus *Ing1* como supresor tumoral en melanoma, cruzamos nuestros animales deficientes en *Ing1* con ratones Tyr::N-Ras^{Q61K}. Los animales resultantes (Tyr-wt, Tyr-+/g, Tyr-g/g), al igual que los transgénicos, presentan una alta pigmentación en la piel, especialmente visible en orejas y patas (Figura 26A). Histológicamente no apreciamos diferencias en las pieles de estos animales observando la presencia de melanocitos y depósitos de melanina en las zonas descritas anteriormente: dermis papilar y tejido graso subcutáneo (Figura 26B).

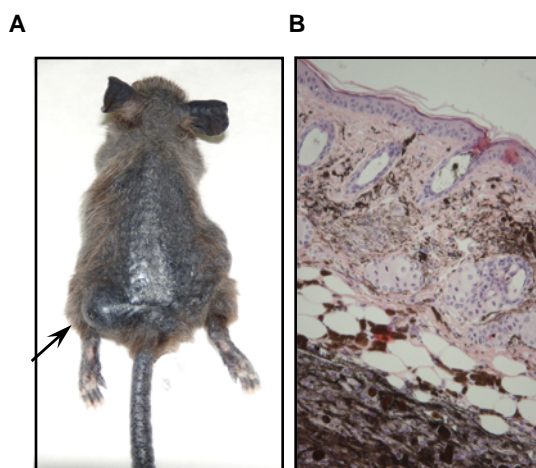


Figura 27: Estudio de la aparición de melanomas en animales transgénicos para N-Ras^{Q61K}. (A) Fotografía de un animal con un melanoma. (B) Imágen de microscopía de campo claro de un melanoma. Tinción con Hematoxilina/eosina. Aumento 200x.

Para realizar el estudio establecimos grupos de 28 animales de los diferentes genotipos, tanto machos como hembras, y monitorizamos la aparición de melanomas observando a los ratones periódicamente y sacrificando aquellos animales moribundos o con lesiones susceptibles de ser malignas. Como control llevamos en paralelo un grupo de 12 animales Tyr::N-Ras^{Q61K} deficientes en el locus *Ink4a/Arf* (Tyr-INK4a^{-/-}). La presencia de melanomas se determinó visualmente o por análisis histopatológico de las muestras obtenidas de los animales sacrificados (Figura 27). En la tabla 11 se recogen los informes histopatológicos de las muestras obtenidas de este ensayo hasta el momento. Observamos que el 60% de los ratones Tyr-INK4a^{-/-} presentaron melanomas tras 30 semanas; en el caso de los ratones Tyr-wt, únicamente aparecieron melanomas en el 7% de los animales, y el tiempo de latencia de estos tumores fue mayor ($54 \pm 12,7$ semanas). En los ratones Tyr-g/g sólo hemos observado por ahora la aparición de un melanoma; estos animales tienen menor edad que los Tyr-wt por lo que lo único que podemos asegurar hasta el momento es que la latencia de los melanomas en ausencia de *Ing1* no es significativamente menor que en los animales silvestres. Sin embargo, en el caso de ratones con una sola copia del casete *gene-trap* (Tyr-+/g) hemos observado una mayor incidencia de melanomas que en los animales wt, 28,6% de los animales del estudio; la latencia de aparición de estos tumores también fue

mayor que para los ratones silvestres ($63,9 \pm 8$ semanas). Analizamos también la aparición de metástasis examinando el hígado y los pulmones de los animales sacrificados, únicamente detectamos metástasis de melanoma en pulmón en uno de los animales Tyr-INK4a^{-/-}, el resto de los animales que desarrollaron melanomas no presentaron metástasis, independientemente de su genotipo. Estos datos, aunque son preliminares, sugieren que la ausencia de *Ing1* puede predisponer a los animales a la aparición de mayor número de melanomas, sin afectar al tiempo de latencia de los mismos. (Tabla 12).

Genotipo	Ratón	Edad (semanas)	Informe
Tyr-wt	8	20	Hiperplasia e hiperqueratosis severa
	71	47,8	Hiperplasia, hiperqueratosis, carcinoma de célula escamosa
	72	47,8	Carcinoma de célula escamosa
	112	63	Melanoma
	127	44,4	Hiperplasia. Carcinoma de célula escamosa
	211	45	Melanoma
Tyr-+/g	4	35,7	Hiperplasia e hiperqueratosis
	18	69,8	Hiperplasia, hiperqueratosis, carcinoma de célula escamosa
	26	69,4	Melanoma
	36	66	Melanoma
	37	65,3	Melanoma
	95	64,6	Melanoma
	115	8,8	Dermatitis
	125	56	Hiperplasia e hiperqueratosis
	132	54,8	Melanoma
	134	53,6	Melanoma
	140	59,3	Melanoma
	157	56	Hiperplasia e hiperqueratosis
Tyr-g/g	133	34,8	Hiperplasia e hiperqueratosis
	180	54,8	Hiperplasia e hiperqueratosis
	27	51	Melanoma
Tyr-INK4a ^{-/-}	16	36,8	Melanoma
	20	27,4	Melanoma
	22	27,4	Melanoma
	24	20,8	Melanoma
	41	28,8	Melanoma
	45	28,8	Melanoma
	53	35	Melanoma

Tabla 11: Análisis histopatológico de muestras obtenidas de animales transgénicos para Tyr::N-Ras^{Q61K}.

Genotipo	Animales con melanoma	Latencia de los melanomas
Tyr wt	2/28 (7,14%)	54 \pm 12,7 semanas
Tyr +/g	8/28 (28,6%)	61,8 \pm 6,02 semanas
Tyr g/g	1/28 (3,5%)	51 semanas
Tyr INK4a ^{-/-}	7/12 (58,3%)	29,3 \pm 5,3 semanas

Tabla 12: Estudio de la latencia e incidencia de los melanomas. Se indica el número de melanomas detectado, así como la latencia de los mismos, en animales de los genotipos indicados.

4.-Búsqueda de posibles reguladores del locus *Ing1*.

Se conoce poco acerca de los mecanismos de regulación del supresor tumoral ING1b. Se sabe que, en ciertos tipos celulares, ING1b se induce en respuesta a radiación UV-C, pero se desconocen los genes responsables de llevar a cabo esta inducción (Nouman et al., 2003). Recientemente se ha descrito que el factor de transcripción RUNX3 se encuentra implicado en la inducción de ING1b en líneas celulares derivadas de carcinoma gástrico (Nagahama et al., 2008). Por tanto, nos propusimos utilizar nuestro modelo de deficiencia en *Ing1* para realizar un ensayo de búsqueda de posibles reguladores de *Ing1* utilizando una librería de expresión génica generada a partir de células madre embrionarias de ratón.

En nuestro modelo, la inserción del casete *gene-trap* en el locus *Ing1* se produce a 67 pares de bases del exón 1c, por lo que las secuencias reguladoras de los exones 1a y 1b se mantienen funcionales. Además, hemos comprobado que el producto de fusión entre el gen de la β -galactosidasa y el gen de resistencia a neomicina (β -geo) se expresa en las células que han incorporado el casete *gene-trap* tanto en uno como en los dos alelos del locus (Figura 28). Por tanto, suponemos que la expresión del transcrito de fusión *Ing1*/ β -geo se encuentra bajo la misma regulación que la expresión del locus *Ing1* endógeno. Por todo esto, consideramos que este modelo de deficiencia en *Ing1* puede ser utilizado para buscar posibles reguladores de la expresión del locus *Ing1*. Además, se han utilizado previamente estrategias similares para analizar la expresión de loci interrumpidos con casetes *gene-trap* (Forrester et al., 1996).

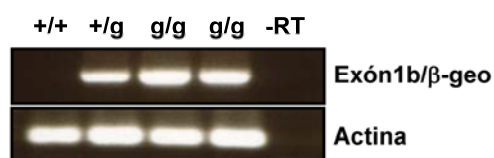


Figura 28: Expresión del casete *gene-trap* en MEFs deficientes en *Ing1*. Análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión del transcrito fusión entre el exón 1b y el casete *gene-trap* en MEFs de los genotipos indicados.

Como primer abordaje para la realización de estos ensayos de búsqueda de reguladores del locus *Ing1* utilizamos la actividad β -galactosidasa del casete *gene-trap*. La medida de esta actividad enzimática puede realizarse por citometría de flujo mediante el uso de un análogo del sustrato de la β -galactosidasa, FDG (*Fluorescein di-β-D-galactopyranoside*), que al ser procesado por la β -galactosidasa produce fluoresceína (Nolan et al., 1988). Sin embargo, en los experimentos realizados para analizar la validez de esta técnica en nuestro modelo no pudimos detectar actividad de la β -galactosidasa en MEFs homocigotos para el casete *gene-trap* (datos no mostrados), por lo que descartamos la utilización de esta actividad enzimática.

Por tanto, para realizar los ensayos de búsqueda nos basamos en la capacidad de las células que han incorporado el casete *gene-trap* de resistir a la acción de la neomicina. La resistencia al antibiótico G-418 es proporcional al nivel de expresión del gen de resistencia a neomicina; esta propiedad se ha utilizado previamente para seleccionar células por su nivel de expresión del gen de resistencia a neomicina (Mortensen et al., 1992). Por tanto el nivel de expresión del casete *gene-trap* determinará la sensibilidad a neomicina en estas células; así, en los MEFs +/g, los reguladores positivos del locus *Ing1* inducirán también la expresión del gen de resistencia a neomicina, permitiéndonos de este modo diferenciar las células en las que se ha inducido *Ing1*, por su mayor resistencia a neomicina, de las que no.

El primer paso en la realización de estos ensayos de búsqueda fue la determinación de la dosis de neomicina que nos permite diferenciar las células que han incorporado el casete *gene-trap* en un alelo de las que lo han incorporado en los dos alelos. Para ello realizamos curvas de supervivencia con dosis crecientes de neomicina y analizamos la supervivencia celular tiñendo las células con Giemsa. Como se observa en la figura 29 a una concentración de 2,5 mg/ml de G-418 los MEFs +/g mueren mientras que los MEFs g/g crecen formando colonias.

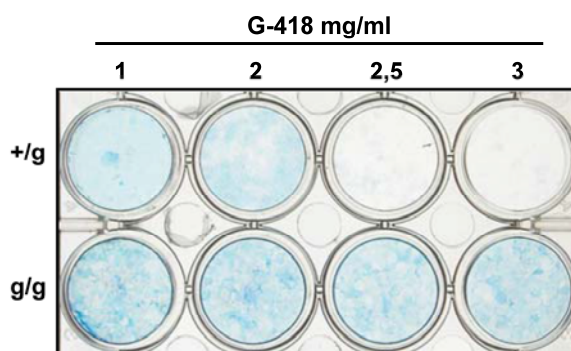


Figura 29: Curva de selección con neomicina (G-418). MEFs de los genotipos indicados e inmortalizados fueron seleccionados durante 14 días con las dosis indicadas del antibiótico G-418. Las células que sobrevivieron a la selección se detectaron por tinción con Giemsa.

El diseño del ensayo de búsqueda de reguladores de *Ing1* se muestra en la figura 30. Para este experimento utilizamos MEFs heterocigotos para el casete *gene-trap*; dado que el ensayo se basa en la capacidad de las células de formar colonias en presencia de neomicina, y debido a que los fibroblastos primarios tienen una capacidad proliferativa limitada, las células utilizadas para este ensayo fueron inmortalizadas utilizando los antígenos grande (LT) y pequeño (ST) del virus SV40. Posteriormente estos MEFs +/g inmortalizados fueron infectados con una librería retroviral de expresión obtenida a partir de ARN de células madre embrionarias de ratón. Tras una primera selección para descartar las células no infectadas, los fibroblastos se plaquearon a baja dilución y se seleccionaron con dos dosis diferentes de neomicina (2 y 3 mg/ml). El ensayo se realizó por duplicado utilizando MEFs procedentes de 2 embriones diferentes. De esta selección con neomicina se obtuvieron varios clones que

fueron picados, expandidos y congelados. En paralelo a los fibroblastos heterocigotos, se cultivaron MEFs tanto wt como g/g que sirvieron de controles del ensayo, así como MEFs +/- infectados con un vector retroviral control.

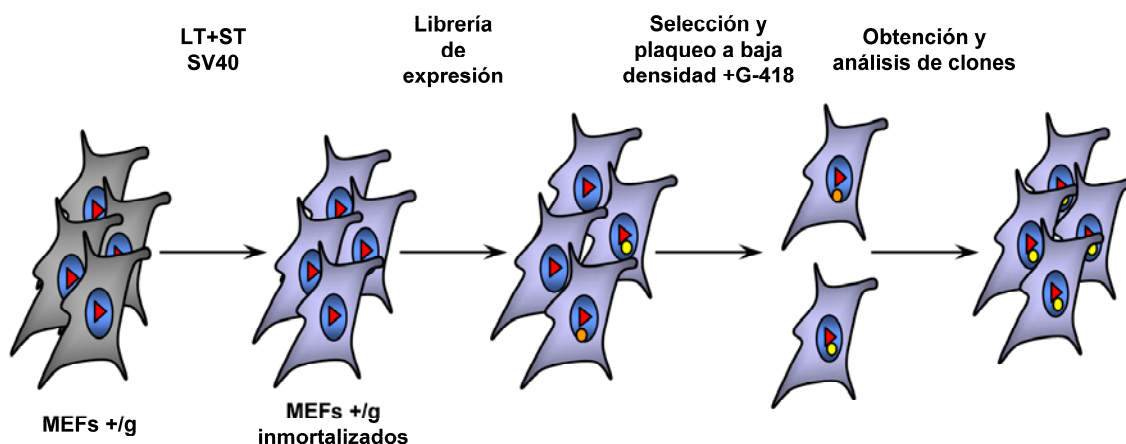


Figura 30: Diseño experimental del ensayo de búsqueda de reguladores de *Ing1*. MEFs +/- fueron inmortalizados e infectados con una librería expresión retroviral, las células infectadas fueron plaqueadas a baja densidad y seleccionadas con neomicina. Las células que hayan incorporado un gen que induzca la expresión de *Ing1* (y por tanto del casete *gene-trap*) serán capaces de crecer en presencia de neomicina.

Para identificar los genes incorporados por los clones resistentes a neomicina, se seleccionaron cuatro clones de cada preparación de MEF (dos por cada dosis de neomicina), se extrajo ARN y se analizó, por secuenciación con oligonucleótidos específicos para el vector, los genes incorporados en cada caso. Como puede verse en la figura 31, la mayoría de los clones analizados incorporaron varias secuencias génicas. El análisis de estas secuencias se resume en la tabla 13.

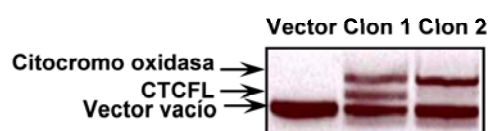


Figura 31: Análisis de los clones obtenidos del ensayo de búsqueda de inductores de *Ing1*. Análisis por RT-PCR de los productos génicos integrados en varios clones obtenidos del ensayo de búsqueda de reguladores de *Ing1*.

Clon	Banda	Secuencia génica
A 2.1	1	Citocromo oxidasa
A 2.2	1	Proteína ribosomal L34
	2	Proteína ribosomal
A 3.1	1	Citocromo oxidasa
A 3.2	1	Citocromo oxidasa
	2	CTCFL
V 2.1	1	Proteína ribosomal L34
	2	CTCFL
V 2.2	1	CTCFL
V 3.1	1	CTCFL
	2	CHCHD2
V 3.2	1	CHCHD2

Tabla 13: Estudio de las secuencias génicas presentes en los clones obtenidos del ensayo de búsqueda de inductores de *Ing1*.

Entre las secuencias obtenidas destaca la proteína CTCFL, también conocida como BORIS, que aparece en el 30% de los clones analizados. Esta proteína se encuentra relacionada con el factor de unión a secuencias tipo CCCTC (CTCF) y es un factor tipo dedos de zinc implicado en regulación génica mediante metilación (Klenova et al., 2002). Otro de los genes más representados es el de la citocromo oxidasa (presente en el 21% de los clones analizados), enzima que cataliza la última reacción en la cadena de transporte electrónico. También identificamos secuencias correspondientes a la proteína ribosomal L34 y a la proteína CHCHD2, presentes ambas en el 14% de los clones analizados.

Discusión.

Desde su descubrimiento, la familia de proteínas ING ha generado un gran interés debido a su implicación en supresión tumoral. ING1b, el miembro fundador y mejor caracterizado de esta familia de proteínas, se ha implicado en diversos procesos celulares como proliferación, reparación de ADN, senescencia y apoptosis; además, y de forma consistente con su papel como supresor tumoral, se han detectado alteraciones del locus *ING1* en varios tipos de tumores humanos. Múltiples evidencias bioquímicas apoyan la participación de estas proteínas en procesos de remodelación de cromatina y regulación transcripcional a través de su asociación con complejos con actividad histona acetil-transferasa e histona deacetilasa; así como su conexión con la vía del supresor tumoral p53.

En este trabajo hemos utilizado un modelo animal de deficiencia en el locus *Ing1* para estudiar el papel de este locus en respuestas de protección antitumoral, tanto a nivel celular como de organismo. Por una parte, hemos analizado el papel del locus *Ing1* en respuestas a estrés genotóxico mediadas por p53, y por otra hemos analizado el papel de *Ing1* como supresor tumoral, estudiando el fenotipo tumoral de animales deficientes en el locus *Ing1*. Finalmente, hemos utilizado células portadoras de una copia del casete *gene-trap* en el locus *Ing1* en una búsqueda de reguladores del locus, con el objetivo de identificar mecanismos responsables de la regulación fisiológica del locus y sus posibles alteraciones en tumores.

El modelo animal de deficiencia en *Ing1* utilizado en este trabajo fue generado mediante la metodología de trampa génica, en la que la inserción de un casete *gene-trap* en el locus *Ing1* de ratón interrumpe el correcto procesamiento de los transcritos del locus, lo que se traduce en la disminución de la expresión de todos los transcritos, así como de la proteína ING1b, tanto en fibroblastos embrionarios como en los órganos de animales adultos, siendo por tanto un buen modelo para el estudio de la pérdida de función de *Ing1*. En el transcurso de este trabajo, se han descrito otros dos modelos animales de inactivación del locus *Ing1* en ratón. Por una parte, el grupo de Stephen N. Jones ha generado un modelo animal deficiente en *Ing1* utilizando también la metodología de trampa génica (Coles et al., 2007); en este caso, la inserción del casete *gene-trap* se produce en el exón 1c del locus, lo que implica la pérdida de expresión de la proteína ING1b, pero no de ING1c, cuyos niveles de expresión se ven incrementados respecto a células silvestres por el tipo de casete *gene-trap* utilizado. El laboratorio de A. Gudkov ha generado un tercer modelo en el que la inactivación del locus *Ing1* se realiza por sustitución, por recombinación homóloga, del exón 2 común del locus *Ing1* por un casete de resistencia a neomicina, lo que conlleva la pérdida total de expresión de todos los productos del locus *Ing1* (Kichina et al., 2006). Es importante destacar que las diferentes estrategias utilizadas han dado lugar a efectos muy diferentes en la expresión de los distintos productos del locus en los diferentes modelos, que deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados obtenidos con cada modelo.

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido estudiar la participación del locus *Ing1* en respuestas mediadas por p53, tanto a nivel celular como a nivel de organismo. La conexión funcional entre ING1b (y otras proteínas ING) y p53 es un tema controvertido. Diversos estudios *in vitro* han relacionado a ING1b, tanto física como funcionalmente con p53, sugiriendo que la presencia funcional de ambas proteínas es necesaria para que puedan llevar a cabo correctamente sus funciones. Así se ha descrito que ING1b es capaz de interaccionar con p53, participar en su activación y actuar como cofactor transcripcional de p53, induciendo la expresión de genes como p21^{CIP1}, Mdm2 o Bax (Garkavtsev et al., 1998; Leung et al., 2002; Kataoka et al., 2003; Cheung y Li, 2002; Zhu et al., 2006; González et al., 2006), además se ha descrito que, en ausencia de p53, la sobreexpresión de ING1b no induce parada de la proliferación celular ni apoptosis en fibroblastos (Cheung y Li, 2002; González et al., 2006; Menéndez et al., 2009). Sin embargo, también existen evidencias de funciones de ING1b independientes de p53. Se ha descrito que ING1b es capaz de modular la expresión génica en ausencia de p53 (Goeman et al., 2005; Feng et al., 2006); además los estudios realizados por los grupos de Andrei V. Gudkov y Stephen N. Jones muestran que los animales deficientes en *Ing1* son susceptibles a la aparición espontánea de linfomas de células B con una latencia de 22 meses; el hecho de que los tumores encontrados en estos animales sean diferentes a los descritos en animales carentes de p53 apoya que ING1b puede tener funciones independientes de p53 en supresión tumoral (Kichina et al., 2006; Coles et al., 2007; Coles et al., 2008).

Nuestro primer abordaje en el estudio de la implicación del locus *Ing1* en funciones mediadas por p53 fue analizar la respuesta a estrés genotóxico mediada por p53 en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en el locus *Ing1*, un modelo de células primarias donde está bien caracterizada esta respuesta. Hemos observado que en respuesta a estímulos que causan estrés genotóxico, p53 se activa de forma correcta en MEFs deficientes en ING1b, presentando unos niveles de fosforilación y acetilación similares a los de fibroblastos embrionarios obtenidos de animales silvestres. En este sentido, a pesar de que la mayoría de los estudios *in vitro* apuntan hacia una implicación de *Ing1* en el proceso de acetilación de p53, también existen evidencias de lo contrario (Nagashima et al., 2001; Kataoka et al., 2003); además, se ha descrito que otros miembros de la familia ING también son capaces de inducir la acetilación de p53, así *Ing2*, el miembro de la familia más relacionado con *Ing1*, es capaz de promover acetilación de p53 en respuesta a diversos estímulos (Nagashima et al., 2001; Pedoux et al., 2005). En nuestro modelo animal detectamos niveles de expresión del ARN mensajero de *Ing2* similares en MEFs tanto de genotipo silvestre como deficientes en *Ing1*, por lo que no podemos descartar que *Ing2* este compensando la falta de *Ing1*. Consistentemente con la activación normal de p53, la sensibilidad de los MEFs a estos tratamientos genotóxicos no se vio alterada

significativamente por la deficiencia en *Ing1*. Resultados similares han sido descritos por el grupo de Andrei V. Gudkov para MEFs deficientes en el locus *Ing1* por recombinación homóloga (Kichina et al., 2006).

Se ha descrito que ING1b se induce en respuesta a radiación UV en queratinocitos primarios, sin embargo esta inducción no se observa en fibroblastos primarios sometidos a radiación (Figura 8) (Cheung et al., 2000), por tanto la participación de ING1b en respuestas a estrés genotóxico puede variar dependiendo del tipo celular analizado.

Curiosamente, el efecto de la deficiencia de *Ing1* en activación de p53 en fibroblastos también parece ser específico del estímulo. Así, nuestros estudios de la respuesta a estrés oncogénico (Figura 14) muestran que MEFs deficientes en *Ing1* presentan alterada la inducción de p53 en respuesta a la expresión del oncogén RasV12; y este defecto se traduce en un defecto en inducción de senescencia por el oncogén RasV12 (Abad et al., 2007). Sin embargo, en nuestro modelo hemos observado que los MEFs generados a partir de animales deficientes en *Ing1* presentan una tasa de proliferación similar a la de MEFs obtenidos de animales silvestres; además, ambos tipos celulares entran en senescencia replicativa y se inmortalizan de manera similar.

La respuesta de p53 a estrés genotóxico varía dependiendo del tipo celular, tejido u órgano analizado, así como del estímulo que origina el daño en el ADN. Para obtener una visión más global del impacto de la deficiencia en *Ing1* en respuestas mediadas por p53, decidimos analizar estas respuestas en diferentes órganos de animales expuestos a irradiación. Hemos observado que al someter a los animales de genotipo normal a una única dosis de radiación gamma de 5 Gy, la inducción de p53 y de su gen diana p21^{CIP1} se produce de manera diferente dependiendo del órgano analizado. Así de los órganos estudiados únicamente detectamos inducción de p53 y de p21^{CIP1} en timo y en vejiga; en intestino, órgano en el que se ha descrito la participación de p53 en respuesta a radiación gamma (Fei et al., 2002) también detectamos inducción de p21^{CIP1}. Observamos que la deficiencia de *Ing1* implica un defecto en la acumulación de p53, y de su diana transcripcional p21^{CIP1}, en varios órganos de animales irradiados, siendo mas evidente en el timo, lo que podría relacionarse con defectos en la respuesta mediada por p53 en este órgano.

Existe cierta controversia acerca del papel de los productos del locus *Ing1* en la regulación de la apoptosis en el timo. Múltiples evidencias *in vitro* sugieren que ING1b tiene un papel proapoptótico en distintos tipos celulares (Helbing et al., 1997; Feng et al., 2006); sin embargo, los estudios realizados en los animales deficientes en *Ing1* muestran resultados diferentes. Estudios en nuestro laboratorio con irradiación de timocitos *ex vivo* tanto de animales silvestres como deficientes en *Ing1* indican que la falta de *Ing1* no altera significativamente la muerte celular espontánea o en respuesta a diversos estímulos genotóxicos (Abad et al., 2007). El grupo de Stephen N. Jones ha descrito que, en su modelo

animal, los timocitos extraídos de animales deficientes en *Ing1* son ligeramente más sensibles a la apoptosis inducida por radiación gamma, aunque no observan diferencias en el grado de apoptosis de las células sin tratar. Estos autores deducen de estos datos un papel antiapoptótico de ING1b en timocitos en respuesta a radiación gamma (Coles et al., 2007). Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con precaución, ya que ambos modelos animales presentan diferencias en cuanto a la expresión de los diversos transcritos del locus *Ing1*, por lo que los resultados pueden reflejar que los distintos productos del locus *Ing1* de ratón realicen funciones diferentes en este contexto.

Para estudiar el posible efecto del locus *Ing1* en la activación de la respuesta mediada por p53 *in vivo*, en este trabajo hemos analizado la expresión de diversas proteínas relacionadas con el supresor tumoral p53, incluyendo dianas transcripcionales de p53, en el timo de animales de diferentes genotipos tras radiación gamma. Este órgano fue elegido por ser el que mostraba efectos diferenciales más claros de la función de *Ing1* en activación de p53 (Figura 9). El análisis global del patrón de expresión en timos irradiados de animales wt mostró la inducción de genes implicados en parada de ciclo celular y en establecimiento de apoptosis así como la represión de genes relacionados con la progresión del ciclo celular, tal como estaba descrito anteriormente (Burns y El-Deiry, 2003). La deficiencia en *Ing1* se tradujo en varios cambios en el patrón de respuesta a irradiación que afectan en gran parte a dianas transcripcionales directas de p53. Por una parte, en los timos de animales *gene-trap* observamos una inducción reducida o ausente de varias dianas de p53 implicadas en parada de la proliferación celular, como ciclina G1, Gadd45 o p21^{CIP1}, o inducción de apoptosis, como FasL o Apaf1, tras irradiación; además, en este órgano detectamos altos niveles de expresión del regulador de p53 Cul9, lo que coincide con una menor acumulación de p53 en respuesta a radiación gamma. Presumiblemente, estos cambios podrían reflejar defectos en la activación de apoptosis y parada del ciclo celular mediadas por p53 tras este estímulo genotóxico en el timo en animales deficientes en *Ing1*.

Sin embargo, nuestros resultados muestran un efecto selectivo en cuanto a la inducción de genes implicados en apoptosis, así por ejemplo no apreciamos diferencias en la expresión de varios genes propapóticos entre los que se encuentra Bax. Estos datos difieren de los del grupo de Stephen Jones quienes describieron, en su modelo animal, la inducción aumentada del gen proapoptótico Bax en los timocitos de animales deficientes en *Ing1* sometidos a radiación gamma (Coles et al., 2007). Estas diferencias pueden deberse, además de a las diferencias ya comentadas entre los dos modelos animales, a diferencias experimentales en cuanto al tiempo y dosis de radiación a la que fueron sometidos los animales en cada caso. Por otra parte, en nuestro estudio detectamos inducción de genes proapoptóticos en los timos de animales *gene-trap* cuya expresión no se ve alterada en los

timos de animales silvestres, lo que podría estar indicando la activación de rutas alternativas de apoptosis en estos órganos.

Para conocer las consecuencias funcionales de los cambios en expresión observados sería interesante estudiar la respuesta apoptótica o tasa de proliferación en este órgano en respuesta a radiación gamma, para comprender el alcance de la deficiencia de *Ing1* en esta respuesta celular. Por otra parte, es necesaria la validación de los resultados obtenidos de este análisis global por ensayos alternativos.

Es importante mencionar que la mayoría de proteínas con expresión diferencial en timos deficientes en *Ing1* irradiados se han identificado como dianas transcripcionales directas de p53. Se ha propuesto que ING1b puede modular la actividad transcripcional de p53 bien regulando su estabilidad o modificaciones posttraduccionales, o como cofactor transcripcional. Los efectos observados sobre genes diana de p53 podrían explicarse mediante estos mecanismos. Otros mecanismos indirectos serían responsables de las alteraciones en reguladores o efectores de la vía de p53.

En relación con la respuesta a nivel de organismo, los estudios del grupo de Andrei Gudkov muestran que los animales deficientes en el locus *Ing1* son más sensibles a un tratamiento repetido con dosis bajas de radiación gamma que los animales silvestres, aunque no aprecian diferencias en la supervivencia de los animales al someterlos a una única dosis alta de radiación gamma. Estos datos sugieren que la deficiencia de *Ing1* podría implicar defectos en la respuesta a daño en el ADN (reparación y/o activación de p53) tras radiación gamma (Kichina et al., 2006). En nuestro caso, sería interesante llevar a cabo ensayos de sensibilidad a estrés genotóxico en nuestra colonia de animales *Ing1*-deficientes. En resumen, son necesarios más ensayos con el fin de determinar el papel de *Ing1* en esta respuesta celular.

El segundo objetivo general de este trabajo ha sido estudiar el fenotipo tumoral de los animales deficientes en *Ing1*. El papel de *ING1* como supresor tumoral está apoyado por su alteración en tumores humanos. Si bien se han descrito algunas mutaciones puntuales de ING1b en tumores humanos, en la mayoría de los casos se observa una menor expresión de ING1b, de forma similar a lo mostrado en nuestro modelo animal. Por tanto, consideramos que nuestro modelo es adecuado para estudiar el papel de *Ing1* como supresor tumoral *in vivo*. Por otra parte, nuestros datos sobre la función de ING1b en senescencia celular en fibroblastos aportan un posible mecanismo para el papel de *Ing1* en supresión tumoral (Abad et al., 2007; Menéndez et al., 2009). La senescencia inducida por oncogenes es uno de los principales mecanismos de supresión tumoral; gracias a la utilización de diversos modelos de tumorigénesis en los que se produce la activación de oncogenes como K-Ras, N-Ras o B-Raf, o la pérdida de supresores tumorales como PTEN, se ha podido identificar la presencia

de células senescentes en lesiones benignas de diversos tipos de tumores y no así en lesiones malignas, lo que refleja el importante papel que juega la senescencia en supresión tumoral *in vivo* (Braig et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2007; Courtois-Cox et al., 2008). Nuestros resultados sugieren que una expresión disminuida de *Ing1* puede suponer un defecto en la activación de las respuestas protectoras frente a la activación de oncogenes a nivel celular, que podrían traducirse en un defecto en la activación de senescencia *in vivo*, debilitando su efecto como barrera antitumoral y favoreciendo la aparición de tumores. Para comprobar esta hipótesis *in vivo*, en este trabajo hemos analizado la implicación de *Ing1* en diversos modelos de tumorigénesis en los que se ha descrito que la senescencia inducida por oncogenes, mediada por p53, tiene un papel esencial.

Uno de los protocolos de carcinogénesis que hemos utilizado es la carcinogénesis química en piel. Este modelo de tumorigénesis permite analizar fácilmente los diferentes estadios de aparición de un tumor; además se ha descrito que el tratamiento con el carcinógeno DMBA provoca la activación del oncogén Ras y que entre las alteraciones que sufren las células de las lesiones benignas en su progresión hacia carcinomas malignos destacan las mutaciones en el supresor tumoral p53 (Balmain y Pragnell, 1983; Quintanilla et al., 1986; Kemp, 2005). Por otra parte se ha descrito que la senescencia inducida por oncogenes es una importante barrera de supresión tumoral en este modelo, así se han identificado células senescentes en las lesiones benignas, papilomas, pero no en tumores malignos o carcinomas (Collado et al., 2005; Sun et al., 2007). El análisis de la expresión de ING1b en las lesiones obtenidas de animales silvestres sometidos al protocolo de carcinogénesis química en piel muestra una acumulación de todos los productos del locus *Ing1* en las lesiones benignas. En estas lesiones, de acuerdo con la activación de la respuesta senescente, se ha descrito la inducción de varios marcadores de senescencia como Dcr2 o p19ARF; la inducción de ING1b en estas muestras sugiere un posible papel del locus *Ing1* como mediador en esta respuesta *in vivo*, consistente con los datos obtenidos en fibroblastos. Sin embargo, no hemos observado pérdida de expresión o inactivación genética del locus *Ing1* en la conversión de estas lesiones a tumores malignos, por lo que la pérdida de función de *Ing1* no parece ser un requisito absoluto para la progresión a carcinoma y escape de senescencia en este sistema. Asimismo, no apreciamos diferencias significativas en cuanto a la latencia o incidencia de aparición de papilomas, o su tasa de conversión a carcinomas, en animales deficientes en *Ing1*. En principio, estos resultados no parecen apoyar un papel esencial del locus *Ing1* en el desarrollo de este tipo de tumores. Sin embargo, conviene tener en cuenta que nuestro modelo es un modelo hipomorfo por lo que no podemos descartar que los niveles residuales de ING1b estén llevando a cabo sus funciones como supresor tumoral.

En el protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón el tratamiento con TPA induce, además de un efecto proliferativo, una respuesta inflamatoria en la piel de los

animales, que coopera en la inducción de tumores en este sistema (Gebhardt et al., 2008). Hemos querido estudiar el posible papel de *Ing1* en esta respuesta inflamatoria. El análisis de la presencia de células inflamatorias en la dermis y del engrosamiento de la epidermis de animales irradiados mostró ligeras diferencias, aunque no estadísticamente significativas, entre ratones de ambos genotipos. Se ha descrito que ING1b es capaz de reprimir la vía de NF- κ B induciendo la expresión de HSP70 y previniendo así la degradación del inhibidor de NF- κ B, I κ B (Coles y Jones, 2009); sin embargo, *Ing2* también se ha relacionado con la regulación de las vías de TGF- β y NF- κ B por lo que puede estar implicado también en procesos inflamatorios (revisado en Coles y Jones, 2009). Por tanto, tampoco podemos descartar que en nuestro modelo animal *Ing2* esté compensando de alguna manera la deficiencia en *Ing1*.

Otro modelo de tumorigénesis en el que hemos analizado el impacto de la pérdida de función de *Ing1* es el protocolo de inducción de fibrosarcomas con 3-metilconlantreno. En este modelo, al igual que ocurría en el anterior, se ha descrito la participación de p53 y la activación de oncogenes como mecanismo responsable de la aparición de tumores. En este caso, tampoco hemos apreciado diferencias significativas en el número ni en la latencia de los tumores generados en animales de los diferentes genotipos, si bien hay que tener en cuenta que el número de tumores obtenidos fue escaso. El estudio de las líneas celulares obtenidas de fibrosarcomas de animales de ambos genotipos muestra que, a pesar de que en ambos casos el índice de mutación de p53 es similar, las células obtenidas de fibrosarcomas de animales deficientes en *Ing1* generan tumores de forma más eficiente, al ser inyectadas en ratones desnudos, que las células obtenidas de fibrosarcomas de animales silvestres, lo que sugiere que la ausencia de *Ing1* confiere una ventaja proliferativa para la formación de tumores *in vivo* por parte de células de fibrosarcoma.

El tercer modelo de carcinogénesis que hemos analizado en este trabajo es la formación de melanomas, otro tipo tumoral en el que se ha descrito la implicación de la senescencia inducida por oncogenes como una barrera esencial para impedir su progresión hacia lesiones malignas. Para realizar estos estudios, cruzamos nuestros animales deficientes en *Ing1* con animales transgénicos en los que la expresión del oncogén N-Ras^{Q61K} está dirigida por el promotor de la tirosinasa, obteniendo de esta manera animales deficientes en *Ing1* y con expresión del oncogén N-Ras^{Q61K} en los melanocitos. El estudio de la aparición de melanomas en estos animales reveló que la falta de *Ing1* no afecta al tiempo de latencia de estos tumores, ya que en los animales transgénicos tanto heterocigotos como homocigotos para el casete *gene-trap* no observamos una aceleración en el momento de aparición de estas lesiones. Sin embargo, los datos que hemos podido extraer de estos animales hasta el momento sugieren que *Ing1* podría tener un papel como supresor tumoral en este tipo de

tumores, ya que los animales heterocigotos para el casete *gene-trap* presentan un mayor número de melanomas que los animales silvestres para *Ing1*, si bien es necesario esperar a que los animales homocigotos para el casete *gene-trap* desarrollen mayor número de tumores para poder sacar conclusiones concluyentes de este estudio. Se han descrito alteraciones de ING1b asociadas a melanomas humanos, estas alteraciones suelen ser mutaciones puntuales que afectan al dominio PHD de la proteína. Se ha relacionado la presencia de estas mutaciones puntuales con un peor pronóstico de la enfermedad (Campos et al., 2004a). En el análisis de los melanomas obtenidos hasta el momento tanto de animales silvestres como de animales heterocigotos para el casete *gene-trap* no hemos observado la aparición de metástasis; sin embargo, consideramos que será interesante analizar el grado de malignidad de los tumores de aparezcan en animales deficientes en *Ing1* ya que este supresor tumoral podría ser importante para su progresión maligna. Además, al igual que en los otros modelos de carcinogénesis que hemos analizado, sería conveniente estudiar en este sistema la presencia de alteraciones en los supresores tumorales p53 y p16INK4a, así como el comportamiento de ING1b en el establecimiento de estas lesiones.

Globalmente, los resultados que hemos obtenido con nuestros ensayos de carcinogénesis en animales deficientes en *Ing1* han reflejado un impacto menor del que cabía esperar en base a las evidencias a nivel celular y molecular que conectan a *Ing1* con senescencia celular, la vía de supresión tumoral de p53, o los datos de alteraciones en tumores humanos. Hay varias posibles explicaciones para estos resultados: por una parte, como se ha comentado anteriormente, nuestro modelo de deficiencia en *Ing1* es un modelo hipomorfo por lo que los niveles residuales de ING1b pueden estar ejerciendo su función como supresor tumoral; además, la expresión de otros miembros de la familia ING no se ve alterada en nuestro modelo por lo que también pueden estar compensando la ausencia de *Ing1*; por otra parte, puede que los modelos de tumorigénesis que hemos elegido para analizar la implicación de *Ing1* no sean los más adecuados, se han descrito alteraciones de ING1b en varios tipos de tumores humanos, entre los que se encuentran el cáncer de mama, de ovario, de esófago o de colon, entre otros (Nouman et al., 2003; Ythier et al., 2008), además se ha descrito que los animales deficientes en *Ing1* presentan linfomas de células B de manera espontánea, por tanto convendría analizar la implicación de *Ing1* en este tipo de tumores; por último, dado que no se conoce aún bien la función de cada producto del locus *Ing1* es posible que ocurran efectos compensatorios u opuestos de los diferentes productos del locus en los modelos de tumorigénesis analizados. Por otra parte, en los ensayos que hemos realizado no hemos podido sacar conclusiones definitivas ya que hemos obtenido pocos carcinomas en los ensayos de carcinogénesis química en piel y pocos fibrosarcomas en el protocolo de 3-metilcolantreno, además es necesario más tiempo para poder estudiar la aparición de melanomas en los animales deficientes en *Ing1*. Tampoco podemos descartar

que sea necesaria la cooperación con otras alteraciones para favorecer la aparición de tumores en los animales deficientes en *Ing1*, así en nuestros propios ensayos hemos observado que la pérdida de *Ing1* confiere a los fibroblastos resistencia a la infección por RasV12 ya que escapan a la parada proliferativa inducida por este oncogén, sin embargo estas células no son totalmente insensibles al estrés oncogénico ya que la infección con el oncogén RasV12 no implica su transformación (Abad et al., 2007).

Por último, en este trabajo hemos utilizado nuestro modelo de deficiencia en *Ing1* como herramienta para realizar un ensayo de búsqueda de reguladores de este supresor tumoral. Existen pocos datos acerca de la regulación de *Ing1*, se sabe que en queratinocitos ING1b se induce en respuesta a radiación UV-C, y que en líneas celulares derivadas de carcinoma gástrico la expresión ectópica de RUNX3 induce la expresión de ING1b (Nouman et al., 2003; Nagahama et al., 2008). Dada la implicación descrita de *Ing1* en mecanismos antitumorales consideramos necesario un estudio mas detallado de su regulación que permita comprender mejor su función como supresor tumoral y sus alteraciones en tumores. Aprovechando el hecho de que en nuestro modelo el casete *gene-trap* se encuentra bajo la misma regulación que el locus *Ing1* endógeno, hemos introducido una librería de expresión génica en fibroblastos embrionarios heterocigotos para el casete *gene-trap* y hemos seleccionado, por su mayor resistencia a neomicina, aquellas células que supuestamente han incorporado un regulador positivo de *Ing1*. El diseño del ensayo de búsqueda favorece la identificación de reguladores que actúen a nivel de transcripción del locus, directa o indirectamente. De esta forma, hemos identificado varias secuencias incorporadas en los clones resistentes a neomicina. Sin embargo, estos datos son preliminares y es necesaria la validación de estos resultados, así como el análisis de otros clones obtenidos en este ensayo, para poder confirmar la identificación de nuevos reguladores de *Ing1*. Entre los resultados obtenidos, nos parece especialmente interesante la proteína CTCFL, también conocida como BORIS, un factor de transcripción nuclear implicado en el reconocimiento y establecimiento de marcas epigenéticas. Esta proteína se encuentra relacionada con otro factor de transcripción (CTCF) que se ha relacionado con procesos de activación y represión transcripcional mediante metilación y que se ha visto implicado en la regulación de varios genes asociados con proliferación celular, entre los que se encuentran p19ARF y p53. Se han descrito alteraciones tanto de BORIS como del factor de transcripción CTCF en diversos tumores humanos (Klenova et al., 2002). Aunque aún es pronto para saber la relevancia funcional de la conexión entre ING1b y BORIS consideramos que sería interesante investigarla; el hecho de que la proteína BORIS se encuentre alterada en tumores podría ser un mecanismo de que explique la desregulación de *ING1* en tumores.

En resumen, el trabajo descrito en esta tesis aporta nuevos datos sobre el papel de *Ing1* como supresor tumoral y su relación funcional con la proteína p53. Utilizando un modelo animal de pérdida de función de *Ing1* hemos demostrado su participación en la inducción de proteínas relacionadas con el supresor tumoral p53 en el timo de animales en respuesta al estrés inducido por radiación gamma. Los datos obtenidos hasta el momento con diversos protocolos de carcinogénesis química muestran que la pérdida parcial de función del locus *Ing1* tiene un efecto muy limitado en tumorigénesis en los tipos celulares analizados. Son necesarios más estudios para elucidar el papel de *Ing1* como supresor tumoral *in vivo*. Por último, hemos desarrollado un sistema que nos permite identificar reguladores positivos del supresor tumoral *Ing1*. La identificación de proteínas implicadas en la regulación de *Ing1* supone un avance significativo para entender la regulación fisiológica de *Ing1* y los posibles mecanismos implicados en su desregulación en tumores humanos.

Conclusiones.

1. Fibroblastos embrionarios obtenidos de animales deficientes en *Ing1* mantienen una capacidad proliferativa normal y no presentan alterada la respuesta celular a estímulos genotóxicos, manteniendo una correcta inducción y activación de p53 en respuesta a estos estímulos.
2. Animales deficientes en *Ing1* muestran un defecto en la inducción de p53, y de su diana transcripcional p21^{CIP1}, en diversos órganos en respuesta a radiación gamma. El análisis del patrón de expresión de genes relacionados con p53 en el timo de animales deficientes en *Ing1* tras irradiación muestra un defecto en la inducción de algunos genes relacionados con parada de ciclo celular o con inducción de apoptosis.
3. En el protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón la expresión de los productos del locus *Ing1* se induce en la formación de las lesiones benignas y no varía en la progresión a tumores malignos. Sin embargo, ni la incidencia y latencia de tumores ni la tasa de conversión de papilomas a carcinomas se ve alterada en los animales deficientes en *Ing1*. El análisis de la respuesta inflamatoria inducida por TPA en estos ensayos no mostró diferencias entre animales de los diversos genotipos.
4. En el protocolo de formación de fibrosarcomas no apreciamos diferencias significativas en el número ni la latencia de los tumores entre animales de los diferentes genotipos. El estudio de líneas celulares derivadas de fibrosarcomas de ratones de los distintos genotipos muestra que las células deficientes en *Ing1* no presentan alterada la tasa de mutación de p53. Estas células forman tumores de forma más eficiente al ser inyectadas en ratones desnudos.
5. Los animales transgénicos para Tyr::N-Ras^{Q61K} y deficientes en *Ing1* desarrollan melanomas con una latencia similar a los animales transgénicos para Tyr::N-Ras^{Q61K} y silvestres para *Ing1*. La deficiencia en *Ing1* podría afectar a la incidencia de estos tumores ya que los animales transgénicos para Tyr::N-Ras^{Q61K} y heterocigotos para el casete *gene-trap* presentan un mayor número de melanomas que los animales transgénicos para Tyr::N-Ras^{Q61K} y silvestres para *Ing1*.

6. Mediante la utilización de fibroblastos embrionarios heterocigotos para el casete *gene-trap* hemos identificado, entre otros, al factor de transcripción CTCFL, o BORIS, como posible regulador del locus *Ing1* de ratón.

Bibliografía.

Abad, M., Menéndez, C., Fuchtbauer, A., Serrano, M., Fuchtbauer, E.M., y Palmero, I. (2007). Ing1 mediates p53 accumulation and chromatin modification in response to oncogenic stress. *J Biol Chem* 282, 31060-31067.

Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., y Beermann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 65, 4005-4011.

Artandi, S.E., y Attardi, L.D. (2005). Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 881-890.

Artero-Castro, A., Kondoh, H., Fernández-Marcos, P., Serrano, M., Ramón y Cajal, S., y Leonart, M. (2009). Rplp1 bypasses replicative senescence and contributes to transformation. *Exp Cell Res* 315, 1372-1383.

Attardi, L.D., de Vries, A., y Jacks, T. (2004). Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene* 23, 973-980.

Balmain, A., y Pragnell, I. (1983). Mouse skin carcinomas induced *in vivo* by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature* 303, 72-74.

Bode, A.M., y Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4, 793-805.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., y Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.

Bremner, R., y Balmain, A. (1990). Genetic changes in skin tumor progression: correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell* 61, 407-417.

Burchiel, S., Thompson, T., Lauer, F., y Oprea, T. (2007). Activation of dioxin response element (DRE)-associated genes by benzo(a)pyrene 3,6-quinone and benzo(a)pyrene 1,6-quinone in MCF-10A human mammary epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 221, 203-214.

Burns, T., y El-Deiry, W. (2003). Microarray analysis of p53 target gene expression patterns in the spleen and thymus in response to ionizing radiation. *Cancer Biol Ther* 2, 431-443.

Campisi, J., y d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729-740.

Campos, E.I., Chin, M.Y., Kuo, W.H., y Li, G. (2004a). Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* 61, 2597-2613.

Campos, E.I., Martinka, M., Mitchell, D.L., Dai, D.L., y Li, G. (2004b). Mutations of the ING1 tumor suppressor gene detected in human melanoma abrogate nucleotide excision repair. *Int J Oncol* 25, 73-80.

Carbone, G., Borrello, M., Molla, A., Rizzetti, M., Pierotti, M., Della Porta, G., y Parmiani, G. (1991). Activation of ras oncogenes and expression of tumor-specific transplantation antigens in methylcholanthrene-induced murine fibrosarcomas. *Int J Cancer* 47, 619-625.

Coles, A., y Jones, S. (2009). The ING gene family in the regulation of cell growth and tumorigenesis. *J Cell Physiol* 218, 45-57.

Coles, A., Marfella, C., Imbalzano, A., Steinman, H., Garlick, D., Gerstein, R., y Jones, S. (2008). p37Ing1b regulates B-cell proliferation and cooperates with p53 to suppress diffuse large B-cell lymphomagenesis. *Cancer Res* 68, 8705-8714.

Coles, A.H., Liang, H., Zhu, Z., Marfella, C.G., Kang, J., Imbalzano, A.N., y Jones, S.N. (2007). Deletion of p37Ing1 in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res* 67, 2054-2061.

Collado, M., Blasco, M.A., y Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223-233.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., *et al.* (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.

Collado, M., y Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 6, 472-476.

Courtois-Cox, S., Jones, S.L., y Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 27, 2801-2809.

Champagne, K., y Kutateladze, T. (2009). Structural insight into histone recognition by the ING PHD fingers. *Curr Drug Targets* 10, 432-441.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., *et al.* (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-730.

Cheung, K.J., Jr., Bush, J.A., Jia, W., y Li, G. (2000). Expression of the novel tumour suppressor p33(ING1) is independent of p53. *Br J Cancer* 83, 1468-1472.

Cheung, K.J., Jr., y Li, G. (2002). p33(ING1) enhances UVB-induced apoptosis in melanoma cells. *Exp Cell Res* 279, 291-298.

Cheung, K.J., Jr., Mitchell, D., Lin, P., y Li, G. (2001). The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA. *Cancer Res* 61, 4974-4977.

Christophorou, M.A., Ringshausen, I., Finch, A.J., Swigart, L.B., y Evan, G.I. (2006). The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* 443, 214-217.

Das, S., Boswell, S., Aaronson, S., y Lee, S. (2008). P53 promoter selection: choosing between life and death. *Cell Cycle* 7, 154-157.

De Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., y Lowe, S.W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 2434-2442.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.

Donehower, L., Harvey, M., Slagle, B., McArthur, M., Montgomery, C.J., Butel, J., y Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A.J., Cote, V., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., Yang, X.J., y Cote, J. (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* 21, 51-64.

Drayton, S., y Peters, G. (2002). Immortalisation and transformation revisited. *Curr Opin Genet Dev* 12, 98-104.

Efeyan, A., Collado, M., Velasco-Miguel, S., y Serrano, M. (2007). Genetic dissection of the role of p21Cip1/Waf1 in p53-mediated tumour suppression. *Oncogene* 26, 1645-1649.

Efeyan, A., Garcia-Cao, I., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., y Serrano, M. (2006). Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 443, 159.

Fei, P., Bernhard, E., y El-Deiry, W. (2002). Tissue-specific induction of p53 targets *in vivo*. *Cancer Res* 62, 7316-7327.

Feng, X., Bonni, S., y Riabowol, K. (2006). HSP70 induction by ING proteins sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 9244-9255.

Feng, X., Hara, Y., y Riabowol, K. (2002). Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol* 12, 532-538.

Forrester, L., Nagy, A., Sam, M., Watt, A., Stevenson, L., Bernstein, A., Joyner, A., y Wurst, W. (1996). An induction gene trap screen in embryonic stem cells: Identification of genes that respond to retinoic acid *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1677-1682.

Garate, M., Campos, E.I., Bush, J.A., Xiao, H., y Li, G. (2007). Phosphorylation of the tumor suppressor p33(ING1b) at Ser-126 influences its protein stability and proliferation of melanoma cells. *FASEB J* 21, 3705-3716.

García-Cao, I., García-Cao, M., Martín-Caballero, J., Criado, L., Klatt, P., Flores, J., Weill, J., Blasco, M., y Serrano, M. (2002). "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 21, 6225-6235.

Garkavtsev, I., Demetrick, D., y Riabowol, K. (1997). Cellular localization and chromosome mapping of a novel candidate tumor suppressor gene (ING1). *Cytogenet Cell Genet* 76, 176-178.

Garkavtsev, I., Grigorian, I.A., Ossovskaya, V.S., Chernov, M.V., Chumakov, P.M., y Gudkov, A.V. (1998). The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* *391*, 295-298.

Garkavtsev, I., Kazarov, A., Gudkov, A., y Riabowol, K. (1996). Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* *14*, 415-420.

Garkavtsev, I., y Riabowol, K. (1997). Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol Cell Biol* *17*, 2014-2019.

Gebhardt, C., Riehl, A., Durchdewald, M., Németh, J., Fürstenberger, G., Müller-Decker, K., Enk, A., Arnold, B., Bierhaus, A., Nawroth, P., *et al.* (2008). RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J Exp Med* *205*, 275-285.

Gil, J., y Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 667-677.

Goeman, F., Thormeyer, D., Abad, M., Serrano, M., Schmidt, O., Palmero, I., y Baniahmad, A. (2005). Growth inhibition by the tumor suppressor p33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras. *Mol Cell Biol* *25*, 422-431.

Gong, W., Russell, M., Suzuki, K., y Riabowol, K. (2006). Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. *Mol Cell Biol* *26*, 2947-2954.

González, L., Freije, J.M., Cal, S., Lopez-Otin, C., Serrano, M., y Palmero, I. (2006). A functional link between the tumour suppressors ARF and p33ING1. *Oncogene* *25*, 5173-5179.

Grossman, S. (2001). p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem* *268*, 2773-2778.

Haferkamp, S., Scurr, L., Becker, T., Frausto, M., Kefford, R., y Rizos, H. (2009). Oncogene-induced senescence does not require the p16(INK4a) or p14ARF melanoma tumor suppressors. *J Invest Dermatol* *129*, 1983-1991.

Hahn, W.C., y Weinberg, R.A. (2002a). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* *2*, 331-341.

Hahn, W.C., y Weinberg, R.A. (2002b). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347**, 1593-1603.

Han, X., Feng, X., Rattner, J.B., Smith, H., Bose, P., Suzuki, K., Soliman, M.A., Scott, M.S., Burke, B.E., y Riabowol, K. (2008). Tethering by lamin A stabilizes and targets the ING1 tumour suppressor. *Nat Cell Biol* **10** 1333-1340.

Hanahan, D., y Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.

Hayon, I., y Haupt, Y. (2002). p53: an internal investigation. *Cell Cycle* **1**, 111-116.

He, G.H., Helbing, C.C., Wagner, M.J., Sensen, C.W., y Riabowol, K. (2005). Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol* **22**, 104-116.

Helbing, C., Veillette, C., Riabowol, K., Johnston, R., y Garkavtsev, I. (1997). A novel candidate tumor suppressor, ING1, is involved in the regulation of apoptosis. *Cancer Res* **57**, 1255-1258.

Hemann, M.T., y Narita, M. (2007). Oncogenes and senescence: breaking down in the fast lane. *Genes Dev* **21**, 1-5.

Iwakuma, T., y Lozano, G. (2003). MDM2, an introduction. *Mol Cancer Res* **1**, 993-1000.

Jacks, T., Remington, L., Williams, B., Schmitt, E., Halachmi, S., Bronson, R., and Weinberg, R. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* **4**, 1-7.

Kataoka, H., Bonnefin, P., Veyra, D., Feng, X., Hara, Y., Miura, Y., Joh, T., Nakabayashi, H., Vaziri, H., Harris, C.C., *et al.* (2003). ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. *Cancer Res* **63**, 5785-5792.

Kemp, C. (2005). Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin Cancer Biol* **15**, 460-473.

Kichina, J.V., Zeremski, M., Aris, L., Gurova, K.V., Walker, E., Franks, R., Nikitin, A.Y., Kiyokawa, H., y Gudkov, A.V. (2006). Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* **25**, 857-866.

Kim, W., y Sharpless, N. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127, 265-275.

Klenova, E., Morse, H.r., Ohlsson, R., y Lobanenko, V. (2002). The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* 12, 399-414.

Kruse, J., y Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-622.

Kuo, W.H., Wang, Y., Wong, R.P., Campos, E.I., y Li, G. (2007). The ING1b tumor suppressor facilitates nucleotide excision repair by promoting chromatin accessibility to XPA. *Exp Cell Res* 313, 1628-1638.

Kurz, E., y Lees-Miller, S. (2004). DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair* 3, 889-900.

Kuzmichev, A., Zhang, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., y Reinberg, D. (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* 22, 835-848.

Larue, L., y Beermann, F. (2007). Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res* 20, 485-497.

Leung, K.M., Po, L.S., Tsang, F.C., Siu, W.Y., Lau, A., Ho, H.T., y Poon, R.Y. (2002). The Candidate Tumor Suppressor ING1b Can Stabilize p53 by Disrupting the Regulation of p53 by MDM2. *Cancer Res* 62, 4890-4893.

Li, J., Wang, Y., Wong, R., y Li, G. (2009). The role of ING tumor suppressors in UV stress response and melanoma progression. *Curr Drug Targets* 10, 455-464.

Maher, S., y Helbing, C. (2009). Modulators of inhibitor of growth (ING) family expression in development and disease. *Curr Drug Targets* 10, 392-405.

Mallette, F., Gaumont-Leclerc, M., y Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21, 43-48.

Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Garcia-Palencia, P., y Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res* 61, 6234-6238.

Mellert, H., Sykes, S., Murphy, M., y McMahon, S. (2007). The ARF/oncogene pathway activates p53 acetylation within the DNA binding domain. *Cell Cycle* 6, 1304-1306.

Menéndez, C., Abad, M., Gómez-Cabello, D., Moreno, A., y Palmero, I. (2009). ING proteins in cellular senescence. *Curr Drug Targets* 10, 406-417.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., y Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.

Millau, J., Bastien, N., y Drouin, R. (2009). P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts. *Mutat Res* 681, 118-133.

Mooi, W., y Peeper, D. (2006). Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 355, 1037-1046.

Mortensen, R., Conner, D., Chao, S., Geisterfer-Lowrance, A., y Seidman, J. (1992). Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Mol Cell Biol* 12, 2391-2395.

Murray-Zmijewski, F., Slee, E.A., y Lu, X. (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 702-712.

Nagahama, Y., Ishimaru, M., Osaki, M., Inoue, T., Maeda, A., Nakada, C., Moriyama, M., Sato, K., Oshimura, M., y Ito, H. (2008). Apoptotic pathway induced by transduction of RUNX3 in the human gastric carcinoma cell line MKN-1. *Cancer Sci* 99, 23-30.

Nagashima, M., Shiseki, M., Miura, K., Hagiwara, K., Linke, S.P., Pedoux, R., Wang, X.W., Yokota, J., Riabowol, K., y Harris, C.C. (2001). DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9671-9676.

Nolan, G., Fiering, S., Nicolas, J., y Herzenberg, L. (1988). Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of *Escherichia coli* lacZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2603-2607.

Nouman, G.S., Anderson, J.J., Lunec, J., y Angus, B. (2003). The role of the tumour suppressor p33 ING1b in human neoplasia. *J Clin Pathol* 56, 491-496.

Nouman, G.S., Anderson, J.J., Wood, K.M., Lunec, J., Hall, A.G., Reid, M.M., y Angus, B. (2002). Loss of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* *55*, 596-601.

O'Brate, A., y Giannakakou, P. (2003). The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat* *6*, 313-322.

Palacios, A., Munoz, I.G., Pantoja-Uceda, D., Marcaida, M.J., Torres, D., Martin-Garcia, J.M., Luque, I., Montoya, G., y Blanco, F.J. (2008). Molecular basis of histone H3K4Me3 recognition by ING4. *J Biol Chem* *283*, 15956-15964.

Palmero, I., Pantoja, C., y Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* *395*, 125-126.

Palmero, I., y Serrano, M. (2001). Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* *333*, 247-256.

Pantoja, C., y Serrano, M. (1999). Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* *18*, 4974-4982.

Pedoux, R., Sengupta, S., Shen, J.C., Demidov, O.N., Saito, S., Onogi, H., Kumamoto, K., Wincovitch, S., Garfield, S.H., McMenamin, M., *et al.* (2005). ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* *25*, 6639-6648.

Pena, P.V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K.L., Verkhusha, V.V., Gozani, O., Zhao, R., y Kutateladze, T.G. (2006). Molecular mechanism of histone H3K4Me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* *442*, 100-103.

Pena, P.V., Hom, R.A., Hung, T., Lin, H., Kuo, A.J., Wong, R.P., Subach, O.M., Champagne, K.S., Zhao, R., Verkhusha, V.V., *et al.* (2008). Histone H3K4Me3 binding is required for the DNA repair and apoptotic activities of ING1 tumor suppressor. *J Mol Biol* *380*, 303-312.

Pietsch, E., Sykes, S., McMahon, S., y Murphy, M. (2008). The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* *27*, 6507-6521.

Ponder, B. (2001). Cancer genetics. *Nature* *411*, 336-341.

Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M., y Balmain, A. (1986). Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* *322*, 78-80.

Reiners, J.J., y Singh, K. (1997). Susceptibility of 129/SvEv mice in two-stage carcinogenesis protocols to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate promotion. *Carcinogenesis* *18*, 593-597.

Ruggeri, B., Caamano, J., Goodrow, T., DiRado, M., Bianchi, A., Trono, D., Conti, C., y Klein-Szanto, A. (1991). Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res* *51*, 6615-6621.

Scott, M., Boisvert, F.M., Vieyra, D., Johnston, R.N., Bazett-Jones, D.P., y Riabowol, K. (2001a). UV induces nucleolar translocation of ING1 through two distinct nucleolar targeting sequences. *Nucleic Acids Res* *29*, 2052-2058.

Scott, M., Bonnefin, P., Vieyra, D., Boisvert, F.M., Young, D., Bazett-Jones, D.P., y Riabowol, K. (2001b). UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* *114*, 3455-3462.

Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., y DePinho, R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* *85*, 27-37.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., y Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593-602.

Shah, S., y Riabowol, K. (2009). Signaling pathways of the ING proteins in apoptosis. *Curr Drug Targets* *10*, 385-391.

Shen, D., Chan, K., Khoo, U., Ngan, H., Xue, W., Chiu, P., Ip, P., y Cheung, A. (2005). Epigenetic and genetic alterations of p33ING1b in ovarian cancer. *Carcinogenesis* *26*, 855-863.

Sherr, C., y McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* *2*, 103.

Sherr, C.J. (2001). The ink4a/arf network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 731-737.

Sherr, C.J., y Weber, J.D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* *10*, 94-99.

- Shi, X., y Gozani, O. (2005). The fellowships of the ING's. *J Cell Biochem* *96*, 1127-1136.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M.R., *et al.* (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* *442*, 96-99.
- Shinoura, N., Muramatsu, Y., Nishimura, M., Yoshida, Y., Saito, A., Yokoyama, T., Furukawa, T., Horii, A., Hashimoto, M., Asai, A., *et al.* (1999). Adenovirus-mediated transfer of p33ING1 with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res* *59*, 5521-5528.
- Siliciano, J., Canman, C., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., y Kastan, M. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* *11*, 3471-3481.
- Skowyra, D., Zeremski, M., Neznanov, N., Li, M., Choi, Y., Uesugi, M., Hauser, C.A., Gu, W., Gudkov, A.V., y Qin, J. (2001). Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem* *276*, 8734-8739.
- Soliman, M.A., y Riabowol, K. (2007). After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends Biochem Sci* *32*, 509-519.
- Stanford, W.L., Epp, T., Reid, T., y Rossant, J. (2006). Gene trapping in embryonic stem cells. *Methods Enzymol* *420*, 136-162.
- Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., *et al.* (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* *128*, 295-308.
- Takahashi, M., Seki, N., Ozaki, T., Kato, M., Kuno, T., Nakagawa, T., Watanabe, K., Miyazaki, K., Ohira, M., Hayashi, S., *et al.* (2002). Identification of the p33(ING1)-regulated genes that include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NMuMG. *Cancer Res* *62*, 2203-2209.
- Tallen, G., Kaiser, I., Krabbe, S., Lass, U., Hartmann, C., Henze, G., Riabowol, K., y von Deimling, A. (2004). No ING1 mutations in human brain tumours but reduced expression in high malignancy grades of astrocytoma. *Int J Cancer* *109*, 476-479.
- Toledo, F., y Wahl, G. (2006). Regulating the p53 pathway: *in vitro* hypotheses, *in vivo* veritas. *Nat Rev Cancer* *6*, 909-923.

Toyama, T., Iwase, H., Watson, P., Muzik, H., Saettler, E., Magliocco, A., DiFrancesco, L., Forsyth, P., Garkavtsev, I., Kobayashi, S., *et al.* (1999). Suppression of ING1 expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* *18*, 5187-5193.

Tsang, F.C., Po, L.S., Leung, K.M., Lau, A., Siu, W.Y., y Poon, R.Y. (2003). ING1b decreases cell proliferation through p53-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett* *553*, 277-285.

Vazquez, A., Bond, E., Levine, A., y Bond, G. (2008). The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* *7*, 979-987.

Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., y Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* *445*, 661-665.

Vieyra, D., Loewith, R., Scott, M., Bonnefin, P., Boisvert, F.M., Cheema, P., Pastyrkova, S., Meijer, M., Johnston, R.N., Bazett-Jones, D.P., *et al.* (2002). Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J Biol Chem* *277*, 29832-29839.

Vieyra, D., Senger, D.L., Toyama, T., Muzik, H., Brasher, P.M., Johnston, R.N., Riabowol, K., y Forsyth, P.A. (2003). Altered subcellular localization and low frequency of mutations of ING1 in human brain tumors. *Clin Cancer Res* *9*, 5952-5961.

Vousden, K., y Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* *2*, 594-604.

Vousden, K., y Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* *137*, 413-431.

Wagner, M.J., y Helbing, C.C. (2005). Multiple variants of the ING1 and ING2 tumor suppressors are differentially expressed and thyroid hormone-responsive in *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* *144*, 38-50.

Walker, G., y Hayward, N. (2002). Pathways to melanoma development: lessons from the mouse. *J Invest Dermatol* *119*, 783-792.

Wang, X., y Harris, C. (1997). p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol* *173*, 247-255.

Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., y Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1, 20-26.

Wexler, H., y Rosenberg, S. (1979). Pulmonary metastases from autochthonous 3-methylcholanthrene-induced murine tumors. *J Natl Cancer Inst* 63, 1393-1395.

Xin, H., Yoon, H.G., Singh, P.B., Wong, J., y Qin, J. (2004). Components of a pathway maintaining histone modification and heterochromatin protein 1 binding at the pericentric heterochromatin in Mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 9539-9546.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., y Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.

Ythier, D., Larrieu, D., Brambilla, C., Brambilla, E., y Pedeut, R. (2008). The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer* 123, 1483-1490.

Yu, H., McDaid, R., Lee, J., Possik, P., Li, L., Kumar, S., Elder, D., Van Belle, P., Gimotty, P., Guerra, M., *et al.* (2009). The role of BRAF mutation and p53 inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes. *Am J Pathol* 174, 2367-2377.

Yu, J., y Zhang, L. (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 851-858.

Zeremski, M., Hill, J.E., Kwek, S.S., Grigorian, I.A., Gurova, K.V., Garkavtsev, I.V., Diatchenko, L., Koonin, E.V., y Gudkov, A.V. (1999). Structure and regulation of the mouse ing1 gene. Three alternative transcripts encode two phd finger proteins that have opposite effects on p53 function. *J Biol Chem* 274, 32172-32181.

Zeremski, M., Horrigan, S., Grigorian, I., Westbrook, C., y Gudkov, A. (1997). Localization of the candidate tumor suppressor gene ING1 to human chromosome 13q34. *Somat Cell Mol Genet* 23, 233-236.

Zhu, J.J., Li, F.B., Zhu, X.F., y Liao, W.M. (2006). The p33ING1b tumor suppressor cooperates with p53 to induce apoptosis in response to etoposide in human osteosarcoma cells. *Life Sci* 78, 1469-1477.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., y Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-2433.

Anexos.

El trabajo presentado en esta memoria de tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones que se adjuntan como anexos:

- Abad, M., Menéndez, C., Fuchtbauer, A., Serrano, M., Fuchtbauer, E.M., and Palmero, I. (2007). Ing1 mediates p53 accumulation and chromatin modification in response to oncogenic stress. *J Biol Chem* 282, 31060-31067.
- Menéndez, C., Abad, M., Gómez-Cabello, D., Moreno, A., and Palmero, I. (2009). ING proteins in cellular senescence. *Curr Drug Targets* 10, 406-417.